N–HYDROXYLIERUNG VON 4,4'–DIAMINODIPHENYLSULFON IN VITRO UND IN VIVO

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Sonja Poplaswki
aus Trechtingshausen

1975

1974

75 208

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546528_0006

N–HYDROXYLIERUNG VON 4,4'–DIAMINODIPHENYLSULFON IN VITRO UND IN VIVO

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Sonja Poplawski
aus Trechtingshausen

1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	27. Juni 1974
Dekan:	Prof. Dr. E. Bayer
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Uehleke
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Voelter

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof.Dr.med. Dipl. Chem. H. Uehleke am Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt (Direktor: Prof. Dr. M. Siess).

Herrn Prof.Dr.med. Dipl. Chem. H. Uehleke danke ich für die Überlassung des Themas und besonders für die intensive Betreuung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Versuche.

Inhaltsübersicht: Seite

1. E I N L E I T U N G 1

1.1. Zur Entwicklung von Dapson 1

1.2. Therapeutische Anwendung von Dapson 2

1.2.1. Lepra 2

1.2.2. Malaria 3

1.2.3. Dermatitis Herpetiformis 4

1.3. Toxische Wirkung von Dapson 4

1.4. Stoffwechsel von Dapson 6

1.5. N-Hydroxylierung von aromatischen Aminen 7

1.6. Ziel der vorliegenden Arbeit 8

2. E X P E R I M E N T E L L E R T E I L 9

2.1. Material 9

2.1.1. Chemikalien 9

2.1.2. Geräte 10

2.1.3. Puffer 11

2.1.4. Versuchspersonen und Tiere 11

2.1.4.1. Versuchspersonen 11

2.1.4.2. Kaninchen 12

2.1.4.3. Hunde 12

2.2. Methoden 12

2.2.1. Synthesen 12

2.2.1.1. 4-Hydroxylamino-4'-aminodiphenylsulfon 12

2.2.1.2. 4,4'-Dihydroxylaminodiphenylsulfon 15

2.2.1.3. 4,4'-Bis(p-aminobenzolsulfonyl)azoxybenzol 16

2.2.1.4. p-Chlorphenylhydroxylamin 17

2.2.1.5. p-Chlornitrosobenzol 17

2.2.2. Bestimmungsmethoden 17

2.2.2.1. DDS Bestimmung 17

2.2.2.2. DDS-NOH Bestimmung 19

2.2.2.3. Bestimmung des N-Oxidationsproduktes von p-Chloranilin aus Inkubationsansätzen 20

2.2.2.3.1. Bestimmung als p-Chlorphenylhydroxylamin 20

2.2.2.3.2. Bestimmung als p-Chlornitrosobenzol 21

2.2.2.4. Cytochrom P-450 Bestimmung 21

2.2.2.5. Methämoglobinbestimmung 22

2.2.2.6. Proteinbestimmung 22

2.2.2.7. UV-Spektren 22

2.2.3. Dünnschichtchromatographie 23

2.2.3.1. Sprühreagenzien 24

2.2.4. Lebermikrosomen 24

2.2.5. Erythrozyten 25

2.2.6. Inkubationen 25

2.2.6.1. NADPH-Regenerierendes System 26

2.2.6.2. Inkubationen mit Mikrosomen 26

2.2.6.3. Inkubationen mit Erythrozyten 26

2.2.6.4. Inkubationen mit Mikrosomen und Erythrozyten 27

2.2.6.5. Inkubationen mit CO Gasmischungen 27

2.2.6.6. Inkubationen mit Glucuronidase und Glusulase 28

3. ERGEBNISSE 29

3.1. Identifizierung der synthetischen Vergleichssubstanzen 29

3.1.1. 4-Nitro-4'-aminodiphenylsulfon 29

3.1.2. 4-Hydroxylamino-4'-aminodiphenylsulfon 29

3.1.3. 4,4'-Dihydroxylaminodiphenylsulfon 30

3.1.4. 4,4'-Bis-(p-aminobenzolsulfonyl)azoxybenzol 30

3.1.5. NMR-Spektren 31

3.2. UV-Absorbtionsspektren von DDS und seinen möglichen Oxydationsprodukten 34

3.3. Identifizierung der entstandenen Metabolite durch Dünnschichtchromatographie 36

3.4. Methämoglobinbildung in vitro als Indikator für die N-Hydroxylierung 39

3.4.1. Methämoglobinbildung in Erythrozyten durch Dapson in Gegenwart von Mikrosomen und NADPH 40

3.4.2. Methämoglobinbildung in Erythrozyten durch DDS-NOH und DDS-di-NOH 42

3.5. Vergleich der analytischen Bestimmungsmethoden aromatischer Hydroxylamine am Beispiel des p-Chlorphenylhydroxylamins 43

3.6. Untersuchungen über die N-Hydroxylierung von Dapson durch Lebermikrosomen 45

3.6.1. Zeitabhängigkeit der Reaktion 45

3.6.2. Substratabhängigkeit der Reaktion 47

3.6.3. Der Einfluß der mikrosomalen Proteinkonzentration auf die N-Hydroxylierungsgeschwindigkeit 48

3.6.4. Mikrosomale N-Hydroxylierung von Dapson in Abhängigkeit von der NADPH-Konzentration und vom pH-Wert 50

3.6.5.	Die N-Hydroxylierung von Dapson durch Mikrosomen von normalen und Phenobarbital vorbehandelten Tieren	52
3.6.6.	Die Hemmung der Dapson N-Hydroxylierung	54
3.7.	N-Hydroxylierung von Dapson in vivo	56
3.7.1.	Dapson Metabolismus in Hunden	56
3.7.2.	Dapson Metabolismus beim Menschen	60
3.8.	Methämoglobinbildung durch Urin von Menschen nach Dapsongabe	64
4.	D I S K U S S I O N	67
4.1.	Methämoglobinbildung durch Dapson	67
4.2.	Quantitative Bestimmung von DDS-NOH	70
4.3.	Mikrosomale N-Hydroxylierung von Dapson	71
4.4.	Identifizierung der Metabolite von Dapson durch Dünnschichtchromatographie	75
4.5.	Dapson-Stoffwechsel im Hund	76
4.6.	Dapson-Stoffwechsel im Menschen	76
5.	Z U S A M M E N F A S S U N G	81
6.	L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	84

ABKÜRZUNGEN

DDS	4,4'-Diaminodiphenylsulfon (Dapson)
DDS-NOH	4-Hydroxylamino-4'-aminodiphenylsulfon
DDS-di-NOH	4,4'-Dihydroxylaminodiphenylsulfon
DDS-NO_2	4-Nitro-4'-aminodiphenylsulfon
DDS-Azoxy	4,4'-bis-(p-Aminobenzolsulfonyl)azoxybenzol
DDS-Acetyl	4-Acetylamino-4'-aminodiphenylsulfon
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Metyrapon	2-Methyl-1,2-di-(3-pyridyl)-1-propanon
Bathophenanthrolin	4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin
G-6-P	Glucose-6-phosphat
G-6-PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion, reduziert
3-PGA	Glycerinaldehyd-3-phosphat
3-PGADH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
1,3-diPGS	1,3-Diphospho-glycerinsäure
Hb^{II}	Hämoglobin
Hb^{III}	Methämoglobin
LDH	Lactatdehydrogenase
NADH	Nikotinamid-adenin-dinucleotid, red.
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, red.

1. EINLEITUNG

1.1. Zur Entwicklung von Dapson

Dapson (4,4'-Diaminodiphenylsulfon) wurde im Jahre 1908 von Fromm und Wittmann (1) synthetisiert. Seine antibakterielle Wirkung wurde 1937 unabhängig voneinander durch Buttle et al. (2) und Fourneau et al. (3) entdeckt. Sie fanden, daß Dapson Streptokokkeninfektionen von Mäusen heilte und die wirksame Dosis viel niedriger lag als die von üblichen Sulfonamiden. Das Sulfon erwies sich jedoch als erheblich toxischer als die gebräuchlichen Sulfonamide. Da man aber damals ähnliche therapeutische Dosen von Sulfonen und Sulfonamiden bei Tieren und Menschen anwandte (4), gab man Patienten mit Streptokokkeninfektionen täglich 1 - 2 g Dapson (5). Dabei traten schwere Anämien und Cyanosen auf. Dapson wurde daraufhin für die Therapie zunächst fallen gelassen, und man versuchte durch Maskierung der offenbar toxischen Aminogruppen besser verträgliche Derivate zu erhalten (N-Maskierung mit: Acetyl-, Formaldehydsulfoxylat-, Acetaldehydsulfonat- und Glucosesulfonatgruppen usw., 6,7,8,9,10). Diese Substituenten werden im Organismus langsam abgespalten, so daß niedrige Konzentrationen von freiem Dapson über lange Zeiten vorhanden sind.

1.2. Therapeutische Anwendung von Dapson

1.2.1. Lepra

Das gebräuchlichste dieser Dapsonderivate war in den vierziger Jahren das Glucosulfon (4,4'-Bis-(1-sulfo-glucosylamino)-diphenylsulfon). Im Jahre 1940 beobachteten Cowdry und Ruangsiri (11) die Wirksamkeit von Glucosulfon gegen Leprainfektionen bei Ratten und 1941 Faget et al. (12) beim Menschen. Glucosulfon wurde daraufhin in den folgenden Jahren mit Erfolg bei Lepra angewendet. Seine Herstellung war jedoch gegenüber nicht substituiertem Dapson sehr viel teurer. Dieser Gesichtspunkt spielte bei 5-12 Millionen Leprakranken gerade in den Armutsgebieten der Welt eine nicht unerhebliche Rolle (13).

Lowe und Smith (14) stellten in eingehenden Untersuchungen fest, daß oral verabreichtes Dapson unverändert und fast vollkommen resorbiert wird, während die meisten substituierten Präparate im Körper verändert werden. Durch Hydrolyse werden im Magen die Seitenketten abgespalten, und die entstandene aktive Komponente Dapson wird dann resorbiert (14,15,16). Daraus ließ sich schließen, daß die geringere Toxizität der DDS-Analoga auf einer kleineren resorbierten Menge von freiem DDS beruht. Daraufhin begann man wieder, Leprakranken freies Dapson in allmählich immer geringerer Dosis zu verabreichen (14,17).

Untersuchungen über die Wirkung von Dapson gegen Mycobacterium Leprae in einem später von Shepard (18) eingeführten Test an Mäusepfoten ergaben minimale Hemmkonzentrationen von 10 ng DDS pro ml Plasma. Dementsprechend liegt heute die therapeutische Dosierung bei 50-100 mg Dapson zweimal pro Woche (19,20). Dapson ist immer noch das am häufigsten verwendete Lepramittel geblieben (21,22).
Um die regelmäßige Einnahme von Dapson bei Leprapatienten zu vermeiden, wird heute auch intramuskulär ein Depot von 300 mg N,N'-Diacetyldapson (Acedapson) alle 75 Tage injiziert, das langsam freies Dapson in die Blutbahn abgibt (23).

1.2.2. Malaria

Bei Untersuchungen der Wirkung von Dapson gegen Tuberkulose und Lepra sahen Coggeshall und Mitarbeiter 1941 (24), daß Glucosulfon auch menschliche Infektionen mit Plasmodium falciparum heilte. Die Autoren vermuteten richtig, daß Glucosulfon gegen experimentelle und humane Malaria eingesetzt werden könnte. Mit Chloroquin, Primaquin und anderen Substanzen waren aber damals ausgezeichnete Malariamittel vorhanden (25), die noch viele Jahre die Therapie beherrschten.
Später, als in Südamerika und Südostasien Stämme von Plasmodium falciparum auftraten, die gegen Chloroquin und andere herkömmliche Malariamittel resistent waren (26,27), gewann Dapson für die Therapie und Prophylaxe der Malaria

eine größere Bedeutung (28,29). Die heute verwendete Dosierung ist so niedrig, daß toxische Nebenwirkungen selten auftreten. Nicht immune Personen kann man gegen resistente Stämme von Plasmodium falciparum durch tägliche Verabreichung von 25 mg Dapson und eine wöchentliche Gabe von Chloroquin-Primaquin schützen (30,31).

1.2.3. Dermatitis Herpetiformis

Dapson hat sich bei der Behandlung von Dermatitis Herpetiformis als sehr wertvoll erwiesen (32). Während z.B. Leprakranke auf kleine Mengen Dapson ansprechen, sind aber in der Therapie der Dermatitis Herpetiformis größere Dosen erforderlich (33,34,35). 100-300 mg DDS pro Tag müssen oft über Jahre hinweg kontinuierlich eingenommen werden (36). Bei dieser Krankheit treten durch die hohe, lang andauernde Dosierung toxische Nebenwirkungen des Dapsons wieder stärker in den Vordergrund.

1.3. Toxische Wirkung von Dapson

Schon bei frühen Studien mit Leprakranken in Nigeria stellte Lowe (37) fest, daß die maximale noch gut verträgliche Dosis etwa 200 mg pro Tag betrug. Höhere Dosen führten gewöhnlich zu Anämien mit Methämoglobinbildung, Cyanosen und Heinz-Körperchen. Die große Halbwertszeit von Dapson (mehr als 20 Stunden, 38,39) bewirkt Akkumulierung

während einer fortlaufenden Behandlung. Auch bei geringeren Dosierungen von DDS und seinen Derivaten bei Lepra (4) und Dermatitis Herpetiformis (40) kam es zu Hämolysen. Es blieb unklar, ob diese Krankheiten die Hämolyse begünstigen oder ob die beschriebenen Patienten an erblichen Enzymdefekten wie Mangel an Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, an Methämoglobinreduktase oder Glutathionreduktase litten. Später wurde der Mechanismus der Toxizität von Dapson genauer untersucht. Nach täglicher Einnahme von 25-100 mg DDS bei normalen Patienten war die Lebensdauer von ^{51}Cr markierten Erythrozyten herabgesetzt (41). Bei einem Teil der Patienten sank der Hämoglobinspiegel auf 80% der Normalwerte. Desforges und Mitarbeiter (42) stellten fest, daß besonders die älteren Erythrozyten (mehr als 50 Tage alt) leicht hämolysieren.

Man vermutete, daß die häufig beobachteten Anämien in den ersten Wochen der Sulfontherapie durch stärkeren Verlust der älteren Erythrozyten bedingt sind, die eine geringere Aktivität an Glutathionreduktase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase besitzen, und daß bei längerer Behandlung die kürzere Lebensdauer der Erythrozyten durch vermehrte Produktion im Knochenmark ausgeglichen wird.

DeGowin (43) verglich die hämolytischen Eigenschaften von Dapson bei normalen und bei an Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel leidenden Personen. Bei letzteren war die hämolytische Wirkung bedeutend größer.

Während des Vietnamkrieges wurden 25 mg DDS täglich und 300 mg Chloroquin wöchentlich als Malariaprophylaxe an

die U.S.-Truppen verabreicht (44). Cohen (45) berichtete 1968 von 6 amerikanischen Soldaten, die nach Einnahme von Antimalariamitteln an schwerer Cyanose litten, so daß sie repatriiert wurden. Er stellte fest, daß die Methämoglobinämie ausschließlich durch die tägliche Gabe von 25 mg DDS hervorgerufen wurde und Chloroquin kein Methämoglobin verursachte. Diese Soldaten und ihre Angehörigen litten an einem erheblichen Mangel der NADH-Methämoglobin-Reduktase in den roten Blutkörperchen.

Neben den angeführten toxischen Wirkungen von Dapson wie Anämien, Methämoglobinämien und Cyanosen wurden selten Agranulozyten (44), periphere Neuropathien (46) und Mononucleosen (47) beobachtet.

1.4. Stoffwechsel von Dapson

Oral eingenommenes Dapson wird fast vollkommen aus dem Magen-Darm-Kanal resorbiert (48). 70-85% der oral verabreichten Dosis werden wieder im Urin ausgeschieden (48,49, 50,51). Dapson wird nur zum kleineren Teil frei und überwiegend konjugiert ausgeschieden.
Als N-Konjugate wurden bisher beschrieben: ein durch Papierchromatographie und Elektrophorese abgetrenntes säurelabiles Mono-N-glucoronid (52) und ein Mono-N-sulfamat (53). Außerdem liegen ausführliche Untersuchungen über die Blutspiegel von Dapson und N-acetyliertem Dapson und über die Ausscheidung als N-Acetyldapson im Urin vor (54,55,56).

1.5. N-Hydroxylierung von aromatischen Aminen

Aus den klinischen Befunden über die toxischen Nebenwirkungen des Dapsons stellte sich die Frage, ob Dapson selber hämolytisch wirkt oder ob Metabolite von Dapson diese Nebenwirkungen verursachen. Dazu waren eingehendere Untersuchungen der entstehenden Stoffwechselprodukte erforderlich.

Es ist bekannt, daß Aufnahme primärer aromatischer Amine oft zu Methämoglobinbildung führt (57). Kiese und Uehleke (58) zeigten, daß in einem System von Leberhomogenat oder Lebermikrosomen mit NADPH und Erythrozyten Arylamine (z.B. Anilin) Hämoglobin zu Methämoglobin oxidieren. Lebermikrosomen, NADPH und Sauerstoff katalysieren die Oxidation der Arylamine zu Arylhydroxylaminen (59,60), die überwiegend für die Methämoglobinbildung verantwortlich sind (57). Auch im Organismus werden Anilin und aromatische Amine N-hydroxyliert (57). Bei der Therapie mit Sulfonamiden tritt ebenfalls gelegentlich als Nebenwirkung Methämoglobinbildung auf (61,62). Thauer et al. (63) untersuchten den Mechanismus der Methämoglobinbildung durch Sulfonamide und stellten fest, daß Lebermikrosomen und NADPH Sulfanilamid in Gegenwart von Sauerstoff zu p-Hydroxylamino-benzolsulfonamid oxidieren. Dieser Metabolit oxidiert sehr wirksam Hämoglobin.

Bei einem Vergleich der Oxidation des Blutfarbstoffes durch verschiedene Sulfonamide war Dapson bei weitem die wirksamste Substanz (64). Es lag nahe, daß hier eine oder beide Aminogruppen zu N-Hydroxygruppen umgewandelt

werden. Aus ähnlichen Untersuchungen über die Methämoglobinbildung durch Dapson vermuteten auch Hjelm und deVerdier (65) die Bildung eines N-Hydroxymetaboliten des Dapsons. Bushby (52) wies ebenfalls in einer Untersuchung über den Metabolismus von Sulfonen auf die mögliche Oxidation an einem Stickstoffatom von Dapson hin. Neuere Erkenntnisse über den Mechanismus der biologischen N-Oxidation und der Hämoglobinoxidation (66,67,68,69,70) waren die Veranlassung, den Stoffwechsel von Dapson besonders im Hinblick auf die N-Hydroxylierung zu untersuchen.

1.6. Ziel der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten die Möglichkeiten der Bildung von N-Oxidationsprodukten des Dapsons im Stoffwechsel untersucht werden.

a) Nach Synthese der N-Hydroxyderivate des Dapsons sollte geprüft werden, ob 4-Hydroxylamino-4'-aminodiphenylsulfon oder 4,4'-Dihydroxylaminodiphenylsulfon in vitro Methämoglobinbildung hervorruft.

b) Weiter sollte untersucht werden, ob und unter welchen Bedingungen diese N-Hydroxyprodukte in vitro durch Lebermikrosomen gebildet werden.

c) Schließlich sollte untersucht werden, in welchem Umfang Dapson in vivo N-hydroxyliert wird und welche Bedeutung dieser Stoffwechsel beim Menschen hat. Zuletzt interessierte noch die Bildung von Konjugaten der Hydroxyderivate.

2. EXPERIMENTELLER TEIL

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Dapson (Ega-Chemie, Steinheim) und 4-Acetylamino-4'-amino-diphenylsulfon (Höchst) wurden durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Äthanol gereinigt. Dinitrodiphenylsulfid wurde von der Fluka AG, Buchs und Ammoniumdinatriumpentacyanoaminferrat von Ega-Chemie bezogen. 1-Chloro-4-nitro-benzol, 4,7-diphenyl-1, 10-phenantrolin P.A., Isoamylalkohol P.A., 4-Methyl-2-pentanon P.A. und alle übrigen Chemikalien waren von der Firma E. Merck, Darmstadt, die letzten beiden wurden nochmals durch Destillation gereinigt. Äther pro analysi (E. Merck) wurde über eine Aluminiumoxid-Säule alle 4 Wochen frisch gereinigt, um Peroxide zu entfernen: 50 g Al_2O_3, W 200, basisch, (Woelm, Eschwege) wurden für 1 l Äther verwendet. Äthylenglykolmonomethyläther (zur Synthese, E. Merck) wurde über Al_2O_3, neutral, (Woelm, Eschwege) gereinigt.

NADP, G-6-P und G-6-PDH wurden von Boehringer, Mannheim bezogen. Glusulase und Glucuronidase waren von Serva, Heidelberg.
Aluminiumoxid-Dünnschicht Fertigplatten, F_{254}, neutral, Typ E und präparative Aluminiumoxyd PSC-Fertigplatten, Typ T der Firma E. Merck, Darmstadt wurden verwendet.

Alle Reagentien und das Wasser für die Hydroxylaminbestimmung müssen frei von Eisen, reduzierenden und oxidierenden Stoffen sein. Alle für die Hydroxylaminbestimmung verwendeten Glasgefäße wurden über Nacht in halbkonzentrierter HCl aufbewahrt und im letzten Spülgang mit destilliertem Wasser gereinigt, da demineralisiertes Wasser manchmal Phenole enthält.

2.1.2. Geräte

Zentrifugen:

Stockzentrifuge von W. Stock, Maschinenbau KG, Marburg/Lahn. Tischzentrifuge "Sorvall-Automatic-Superspeed" von I. Sorvall, Inc., Norwalk, Conn., (USA). Ultrazentrifuge Beckmann Modell L von Beckmann Instruments Inc., Palo Alto, Cal., (USA) mit Rotor 30.

Spektrophotometer

Spektralphotometer PMQ 2 Zeiss, Oberkochen. Unicam Sp 1800 Ultraviolett Spektralphotometer mit Schreiber von Pye-Unicam. Registrierendes Spektralphotometer Beckmann DK 2.

Sonstiges

Schüttelmaschine von Jahn und Kunkel KG, Staufen im Breisgau, Desaga Präparierbox zum Applizieren sauerstoffempfindlicher Substanzgemische auf DC Platten.
pH-Meter Präzisionsmodell E 187 Metrohm AG, Herisau Schweiz.
Whirlmix von Cenco Instruments N.V., Breda Holland,
Rotationsverdampfer Rotavapor R von Büchi, Flawil, Schweiz,

Laborrührer Typ MCH von Jahnke und Kunkel, Staufen i. Breisg. Marburgpipetten von Eppendorf, Hamburg. Mikroliterspritzen von Terumo, Mikroliter Syringe. Homogenisatoren nach Art von Potter-Elvehjem aus Plexiglas, Eigenbau.
Thermostatisches Kühlaggregat, Typ TK1, Rheinische Gerätebau.

2.1.3. Puffer

0,05 M Tris-HCL-Puffer mit 0,1 M KCL
1 M Natriumacetat Puffer pH 4,5 mit 1 mM $FeCl_3$.
0,2 M Natriumacetat Puffer pH 5.
0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 und pH 6,8.
Krebs-Ringer-Lösung: NaCl 9,0 g/l, KCL 0,46 g/l, KH_2PO_4 0,21 g/l, $MgSO_4$ x 7 H_2O 0,38 g/l.
Krebs-Ringer-Phosphatpuffer: 3 Teile Krebs-Ringer-Lösung und 1 Teil Phosphatpuffer pH 7,4 wurden vermischt. Die Gesamtmolarität der Lösung beträgt 0,148.

2.1.4. Versuchspersonen und Tiere

2.1.4.1. Versuchspersonen

Die Probanden nahmen vor Dapsoneinnahme ein leichtes Frühstück zu sich. Während der Versuchsdauer wurden keine Medikamente, Alkohol oder Coffein genommen. Gewicht und Geschlecht der Versuchspersonen sind in Tab. Nr. 3 angegeben.

2.1.4.2. Kaninchen:

Junge männliche Kaninchen (Rasse: Thüringer Gemse, institutseigene Zucht) wurden mit Standarddiät gefüttert (Brand-Purina) und erhielten Trinkwasser nach Belieben. Um das mikrosomale Enzymsystem der Tiere zu stimulieren, wurde dem Trinkwasser 12 Tage lang 0,1% Na-Phenobarbital zugesetzt. 40 - 48 Stunden bevor man die Tiere tötete, wurde ihnen das Futter entzogen und das barbiturathaltige Wasser durch normales Trinkwasser ersetzt.

2.1.4.3. Hunde:

Weibliche reinrassige Beaglehunde (eigene Zucht) wurden mit Standarddiät gefüttert (Altromin H). Das durchschnittliche Gewicht betrug 10-12 kg. 24 Stunden vor der Dapsoneinnahme wurde das Futter entfernt. Der Urin wurde durch Katheterisierung gewonnen. Über Nacht wurden die Hunde in einen Stoffwechselkäfig gesetzt, um den Urin zu sammeln. Das Sammelgefäß tauchte in eine Glycerin-Wasser-Mischung ein, die durch ein Kühlaggregat auf -20° C gehalten wurde.

2.2. Methoden

2.2.1. Synthesen

2.2.1.1. 4-Hydroxylamino-4'-aminodiphenylsulfon

I. 4-Nitro-4'-aminodiphenylsulfid (71,72,73)

Die Synthese geht im wesentlichen auf Lantz (71) zurück.

In eine heiße Lösung von 160 g Na_2S x 9 H_2O in 670 ml Wasser wurden langsam unter Rühren 43 g p-Chlornitrobenzol zugegeben und 8 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Dann wurden weitere 43 g p-Chlornitrobenzol hinzugefügt und noch 10 Stunden am Rückfluß gekocht. Die Mischung wurde dann über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen und das überschüssige p-Chlornitrobenzol durch Wasserdampfdestillation abgetrennt. Nach Abkühlung des Rückstandes wurden die orange-gelben Kristalle abgesaugt und aus Äthanol umkristallisiert. Ausbeute 55,2 g. Fp. = 141° C.

II. N-Nitro-4'-acetylaminodiphenylsulfid (74)

30 g 4-Nitro-4'-aminodiphenylsulfid wurden mit 150 ml Acetylchlorid 2 Stunden am Rückflußkühler unter leichtem Rühren bei ca 50° C gehalten. Nach Erkalten der Lösung (0° C) wurde der schmutzig gelb-grüne Niederschlag abgesaugt und solange mit Eiswasser gewaschen, bis der pH der Lösung neutral war. Die Ausbeute betrug 95%. Das Produkt kristallisierte aus dem 20-fachen Volumen Äthanol unter Zusatz von Aktivkohle in Form von hellgelben Nadeln aus.

III. 4-Nitro-4'-acetylaminodiphenylsulfon (74)

20 g 4-Nitro-4'-acetylaminodiphenylsulfid wurden in 400 ml Eisessig gelöst und 20 ml 30% H_2O_2 hinzugefügt. Nach 4 Stunden Erhitzen im kochenden Wasserbad wurde die Lösung in 5 l Eiswasser gegossen und 48 Stunden stehen

gelassen. Der Niederschlag wurde abgenutscht, mit Wasser säurefrei gewaschen und aus Äthanol umkristallisiert. Die Ausbeute nach Umkristallisation betrug 88%. Man erhielt ein weißes Pulver vom Schmelzpunkt 220-222° C.

IV. 4-Nitro-4'-aminodiphenylsulfon

15 g 4-Nitro-4'-acetylaminodiphenylsulfon wurden in 450 ml 18% HCl zuerst 30 min im Wasserbad erhitzt und dann weitere 30 min im Ölbad gekocht. Nach Abkühlen wurde mit Na_2CO_3 der pH auf 8 gebracht, über Nacht stehen gelassen und der ausgefallene Niederschlag abgesaugt. Nach Umkristallisieren aus dem 90-fachen Volumen Äthanol fielen gelbe Nadeln mit einem Schmelzpunkt von 169° C aus. Die Ausbeute betrug 78%.

V. 4-Hydroxylamino-4'-aminodiphenylsulfon (75)

Zu einer Lösung von 6,6 g 4-Nitro-4'-aminodiphenylsulfon in 280 ml Äthanol wurde bei 50° C unter Rühren eine Lösung von 13 g NH_4Cl in 120 ml H_2O hinzugefügt. Nach Zugabe von 5 g Zinkstaub innerhalb von 5 min wurde noch weitere 15 min bei 50° C gerührt. Die Mischung wurde abgekühlt, 30 min in Eis gestellt und dann abfiltriert. Nach Waschen des Rückstandes mit kaltem Äthanol wurde das Filtrat im Vakuum unter Stickstoff auf 80 ml eingeengt (Wasserbadtemperatur = 35° C). Der Niederschlag wurde nach Abkühlen abgenutscht, mit kaltem Wasser gewaschen und über $CaCl_2$ getrocknet. Man erhielt 5,5 g eines orange-gelben Pulvers.

Zur Umkristallisation von 4-Hydroxylamino-4'-aminodiphe-

nylsulfon wurden das verwendete Aceton und H_2O mit Stickstoff gesättigt; das Wasser enthielt außerdem 0,2% Mercaptoäthanol.

5,5 g V wurden in 50 ml kaltem Aceton gelöst und mit 95 ml kaltem H_2O versetzt. Nach 30 min wurde der orangegelbe Niederschlag durch Abfiltrieren entfernt. Nach weiterem Verdünnen des Filtrats mit 600 ml H_2O fielen blaß-gelbe Kristalle von V aus, die nach einer Stunde abgenutscht und mit kaltem Wasser gewaschen wurden. Ausbeute 3 g, Fp = 188° C. Zur weiteren Reinigung wurde das bei der Umkristallisation erhaltene hell-gelbe Produkt bei Bedarf in kleineren Mengen nach dem gleichen Verfahren ein zweites Mal umkristallisiert. Man erhielt weiße Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 191° C.

2.2.1.2. 4,4'-Dihydroxylaminodiphenylsulfon

I. Dinitrodiphenylsulfon (1)

10 g Dinitrodiphenylsulfid wurden nach Fromm und Wittmann (1) in 200 ml Eisessig gelöst und die Mischung auf 90-95° C erhitzt. Dann wurde eine Lösung von 12 g $K_2Cr_2O_7$ in 150 ml H_2SO_4 kalt zugesetzt und weitere 10 min erhitzt. Anschließend wurde die Mischung in 200 ml Eiswasser gegossen. Das auskristallisierte Produkt wurde aus dem 60fachen Volumen Eisessig umkristallisiert. Ausbeute 75%. Fp = 282° C.

II. 4,4'-Dihydroxylaminodiphenylsulfon

Die Dinitroverbindung wurde analog der Mononitroverbindung zum Hydroxylamin reduziert.

Zu einem warmen Gemisch von 4 g 4,4'-Dinitrodiphenylsulfon

in 200 ml Alkohol wurde eine Lösung von 15 g NH_4Cl in 100 ml H_2O zugegeben. Unter kräftigem Rühren wurden 8 g Zinkstaub in kleinen Portionen innerhalb von 15 min eingetragen. Die Temperatur betrug 55-60° C. Darauf wurde das Reaktionsgemisch für 60 min in Eis gestellt, anschließend abgenutscht und mit heißem Äthanol gewaschen. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer unter Stickstoff auf 80 ml eingeengt. Das dabei ausgefallene gelb-orange Produkt (150 mg) wurde abgesaugt, das Filtrat nochmals mit Stickstoff gesättigt und über Nacht kalt stehen gelassen. Man erhielt 600 mg schmutzig-gelbe Nadeln.

250 mg II wurden in 80 ml kochendes, mit Stickstoff durchströmtes und 0,2% Mercaptoäthanol enthaltendes Wasser gegeben und etwa 5 min am Sieden gehalten. Es wurde von dem w-enigen Ungelösten abfiltriert und über Nacht in der Kälte stehen gelassen. Man erhielt 150 mg lange weiße Nadeln. Fp = 179° C.

2.2.1.3. 4,4'-Bis-(p-aminobenzolsulfonyl)azoxybenzol

Nach Jackson (75) oxidiert 4-Hydroxylamino-4'-aminodiphenylsulfon in wässrigem Pyridin oder in alkalischer Lösung leicht zu DDS-Azoxy. 150 mg DDS-NOH wurden in 2 ml Pyridin gelöst, mit 6 ml H_2O versetzt und anschließend kräftig geschüttelt. Es bildete sich ein gelber Niederschlag. Dann wurde die Mischung auf 80° C erhitzt, nochmals mit 4 ml H_2O versetzt und 2 Stunden stehen gelassen. Nach Zentrifugation

wurde der Überstand verworfen und der Niederschlag wieder in 2 ml Pyridin gelöst. Dann wurden 5 ml Wasser zugegeben und 3 Stunden stehen gelassen. Der nach der Zentrifugation erhaltene Niederschlag wurde noch 2 mal aus Pyridin umkristallisiert und anschließend mehrmals mit Wasser und Äthanol gewaschen. Fp = 295-298° C.

2.2.1.4. p-Chlorphenylhydroxylamin

p-Chlorphenylhydroxylamin wurde nach Bamberger und Baudisch (76) durch Reduktion von p-Chlornitrobenzol durch Zinkstaub in wässrig-alkoholischer NH_4Cl-Lösung hergestellt.

2.2.1.5. p-Chlornitrosobenzol

p-Chlornitrosobenzol wurde nach Ingold (77) aus p-Chloranilin durch Oxidation mit Ammoniumpersulfat gewonnen.

2.2.2. Bestimmungsmethoden

Die DDS, DDS-NOH, p-Chlorhydroxylamin und p-Chlornitrosobenzolbestimmungen wurden in geeichten Schliffzentrifugengläsern mit Stopfen ausgeführt.

2.2.2.1. DDS Bestimmung

2 ml Urin oder Plasma (wenn erforderlich verdünnt) wurden mit 8 ml Methylisobutylketon 10 min lang geschüttelt. Nach Zentrifugieren wurden 6 ml der organischen Phase mit 0,1 ml

2 N NaOH 5 min geschüttelt, um vorhandenes DDS-NOH zum DDS-Azoxy zu oxidieren (75); (der Metabolit DDS-NOH stört die Bestimmung des DDS, da er diazotiert und gekuppelt werden kann). Danach wurde die organische Phase 10 min mit 3 ml 2 N HCl extrahiert (78) und dann das Amin in der salzsauren Lösung nach Bratton und Marshall (79) bestimmt. Zu 2 ml der Säurephase wurden 0,2 ml 0,5% $NaNO_2$ hinzugefügt. Nach 10 min wurde die Lösung mit 0,4 ml 2,5% Ammoniumsulphamat vermischt und nach weiteren 5 min 0,2 ml 0,2% N-1-Naphtyläthylendiammoniumdichlorid hinzugefügt. Die Extinktion wurde nach 10 min Stehen im Zeiss Photometer bei 540 nm bestimmt. Der Empfindlichkeitsbereich liegt bei diesem Verfahren zwischen 0,5 - 10 µg pro ml Urin oder Plasma (in diesem Analysengang ergeben 10 µg DDS pro ml Urin eine Extinktion von 0.69 und 10 µg DDS pro ml Plasma eine Extinktion von 0,625 bei 540 nm, 1 cm Schicht).

Da die Dapsonkonzentrationen im menschlichen Plasma zum Teil sehr niedrig waren, wurden 2 ml Plasma mit 8 ml Methylisobutylketon extrahiert und 6 ml der organischen Phase mit 1,5 ml 2 N HCl ausgeschüttelt. Die Diazotierung wurde mit dem halben Volumen der oben angeführten Reagentien ausgeführt und die Extinktion in Mikroküvetten gemessen.

Beim konjugierten Dapson wird in der Literatur zwischen säurelabilem und säurehydrolysierbarem DDS unterschieden. (78,51). Um säurelabiles DDS zu spalten, wurden 2 ml Urin mit 1 ml 1 N HCl eine Stunde bei Zimmertemperatur hydrolysiert

und anschließend mit 1 ml 1 N NaOH neutralisiert.
Im Urin vorhandenes DDS-Acetyl wird sowohl bei der Bestimmung des freien als auch des säurelabilen Dapsons mit erfaßt, da sich die freie Aminogruppe des DDS-Acetyl diazotieren und kuppeln läßt. Nach Dapsoneinnahme wurden von Gelber et al. (54) und Gordon et al. (55) jedoch im menschlichen Urin nur geringe Mengen (0,1 - 1% freies und 1,5 - 3% säurelabiles) der verabreichten Dosis als DDS-Acetyl gefunden.
Säurehydrolysierbares DDS wurde mit 2 N HCl unter den gleichen Bedingungen wie oben in verschlossenen Gläsern im kochenden Wasserbad hydrolysiert.

2.2.2.2. DDS-NOH Bestimmung

Aus Urin

2 ml Urin (falls erforderlich verdünnt) wurden mit 3 ml Äther 10 min extrahiert. Nach Abzentrifugieren wurden 2 ml der Ätherschicht zu einer Lösung von 2 ml 0,003 M 4,7-Diphenyl-1,10-phenantrolin in Isoamylalkohol pipettiert. Die Mischung wurde kräftig 5 min mit 2 ml 1 M Natriumacetatpuffer (pH 4,5), der 0,003 M $FeCl_3$ enthielt, geschüttelt. Das Hydroxylamin reduziert quantitativ Fe^{3+} zu Fe^{2+}, das in der organischen Phase einen Komplex mit 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin bildet, der rot gefärbt ist (80,81). Die Absorption des Komplexes wurde bei 535 nm gegen den entsprechenden Leerwert gemessen. Der Empfindlichkeitsbereich liegt bei dieser Methode zwischen 1 - 20 µg/ml Urin (10 µg DDS-NOH/ml Urin ergeben in diesem Analysengang eine Extinktion von 0,435 bei 535 nm, 1 cm Schicht). Die Verteilung von

DDS-NOH aus Phosphatpuffer (pH 7,0) in Äther beträgt bei den in Frage kommenden Konzentrationen etwa 98%. Die Bestimmung der Verteilung des Hydroxylamins erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei 288 nm.
Um das konjugierte DDS-NOH zu bestimmen, wurden 2 ml Urin mit 1 ml 1 N HCl eine Stunde bei Zimmertemperatur hydrolysiert und anschließend mit 1 ml 50% Natriumacetat auf pH 5 - 6 abgepuffert.

Aus Inkubationsansätzen mit Mikrosomen

2 ml der Inkubationsansätze wurden mit 1 ml 12% TCE gefällt, und nach Zentrifugieren wurden 2 ml des Überstandes mit 1 ml 12% Natriumacetat auf pH 5-6 abgepuffert und dann mit 3 ml Äther extrahiert. Die weitere Bestimmung erfolgte wie oben.
Die Eichkurven erhielt man, indem man den Inkubationsansätzen oder dem Urin bekannte Mengen von DDS-NOH zusetzte.

2.2.2.3. Bestimmung des N-Oxidationsproduktes von p-Chloranilin aus Inkubationsansätzen

2.2.2.3.1. Bestimmung als p-Chlorphenylhydroxylamin

Die Bestimmung wurde entsprechend der DDS-NOH Bestimmung ausgeführt. Anstatt Äther wurde CCl_4 als Extraktionsmittel verwendet. Die Eichkurve wurde mit frisch synthetisiertem p-Chlorphenylhydroxylamin aufgestellt.

2.2.2.3.2. Bestimmung als Chlornitrosobenzol (82)

Das Reaktionsprodukt p-Chlorphenylhydroxylamin wurde mit $K_3\left[Fe(CN)_6\right]$ zu p-Chlornitrosobenzol oxidiert. Das nicht umgesetzte Amin wurde durch Waschen mit 0,1 N H_2SO_4 entfernt und das verbleibende p-Chlornitrosobenzol diazotiert und gekuppelt.

In ein Schliffglas mit 6 ml CCl_4, 6 ml 0,1 N H_2SO_4 und 0,1 ml 10% $K_3\left[Fe(CN)_6\right]$ wurden 2 ml des Inkubationsansatzes pipettiert und sofort 5 min kräftig geschüttelt. Nach Zentrifugation wurde die wässrige Phase abgesaugt, die organische Phase 3 x mit 0,1 N H_2SO_4 gewaschen und 1 x mit Wasser nachgewaschen.

4 ml der gewaschenen CCl_4-Phase wurden mit 2 ml Eisessig gemischt, 0,1 ml 20% $NaNO_2$ zugegeben und 20 min stehen gelassen. Danach wurde die Mischung mit 0,2 ml 50% Ammoniumsulfamat kräftig geschüttelt und nach 10 min 0,1 ml 0,5% N-1-Naphtyläthylendiammoniumdichlorid hinzugefügt. Nach 2 Stunden Stehen im Dunkeln wurde die Essigsäureschicht mit 80% Essigsäure auf 5 ml aufgefüllt und die Extinktion des Farbstoffes in der Essigsäure bei 560 nm im Photometer gemessen.

Die Eichkurve wurde mit frisch umkristallisiertem p-Chlornitrosobenzol aufgestellt.

2.2.2.4. Cytochrom P-450 Bestimmung

Die Bestimmung des Cytochrom P-450 in den Mikrosomen erfolgte im Pye-Unicam SP 1800 als CO-Differenzspektrum

nach Omura und Sato (83). Dazu wurde die Mikrosomensuspension (2 mg mikrosomales Protein pro ml) mit einer Spatelspitze festem $Na_2S_2O_4$ reduziert und in zwei 1 cm Küvetten gegeben. Dann wurde die Meßküvette 30 sec mit CO durchperlt und nach 3 min die Extinktion von 360-550 nm gegen die Referenzküvette registriert. Nach Omura und Sato beträgt die millimolare Extinktion (Differenz zwischen 450 und 490 nm) des CO-Komplexes von reduziertem Cytochrom P-450 etwa 91.

2.2.2.5. Methämoglobinbestimmung

Die Erythrozyten wurden zur Methämoglobinbestimmung in CO gesättigtem Wasser und zur Hämoglobinbestimmung in Wasser hämolysiert und bei 3000 g die Erythrozytenmembranen 30 min abzentrifugiert. Nach Zugabe von Phosphatpuffer (pH 6,8) wurde Methämoglobin durch die Zunahme der Extinktion der Lösung nach Hinzufügen von Cyanid im Photometer bei 550 nm bestimmt. Gesamtblutfarbstoff wurde nach Oxidation mit Kaliumferricyanid als Methämoglobin gemessen (64).

2.2.2.6. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (84).

2.2.2.7. UV-Spektren

Die UV-Spektren wurden im Beckmann DK-2 Photometer in einer 1 cm Küvette aufgenommen. Für DDS, DDS-NOH, DDS-

di-NOH und DDS-NO_2 wurde Äther und für DDS-Azoxy wurde Äthylenglykolmonomethyläther verwendet.

2.2.3. Dünnschichtchromatographie

DC-Platten: 0,2 mm Al_2O_3 neutral, F_{254} (Typ E) auf DC-Aluminiumfolie.

Die Urinproben wurden vor und nach Hydrolyse in Äther extrahiert. Die Hydrolyse wurde 1 Stunde mit 1 N HCl bei Zimmertemperatur durchgeführt (2 Teile Urin + 1 Teil 1 N HCl) und die Mischung mit 1 N NaOH bis pH 5-6 neutralisiert. Bei Inkubaten mit Mikrosomen wurde nach Fällung mit Trichloressigsäure der Überstand mit NaOH auf pH 5-6 gebracht. Nach Neutralisieren wurden die Proben in Äther extrahiert und die Ätherschicht über Na_2SO_4 getrocknet. Dann wurde der Äther bei einer Wasserbadtemperatur von 25° C mittels Durchströmen von Stickstoff bis zur Trockne entfernt. Anschließend wurden die Proben in Aceton aufgenommen und unter Stickstoff in der Desaga Präparierbox auf Dünnschichtplatten aufgetragen.

Zum Entwickeln wurden folgende Lösungsmittelsysteme verwendet:

I	Chloroform + Methanol	(85 + 15, V/V)
II	Aceton + Methanol + Hexan	(10 + 40 + 40, V/V)
III	Äthylacetat + Isopropanol + Hexan	(30 + 40 + 30, V/V)

System I war durch sein bestes Trennergebnis das vorwiegend gebrauchte Lösungsmittelgemisch.

Die einzelnen Flecke wurden durch ihre UV-Absorption nachgewiesen, da alle Metabolite des Dapsons UV-Absorption aufweisen.

2.2.3.1. Sprühreagenzien

Pentacyanoaminferrat

Es wurden 15 ml einer 1% Lösung von Ammoniumdinatriumpentacyanoaminferrat in 20% Alkohol mit 5 ml 20% NaOH vermischt und die Mischung mit 0,1 ml 3% H_2O_2 versetzt. Nach Einwirkung von Tageslicht und leichtem Erwärmen der Platten (ca 60° C) färben sich die Flecken von DDS blau, die von DDS-NOH und DDS-di-NOH violett.

Ammoniakalisches Silbernitrat

Nach Besprühen der Platten mit einer frisch bereiteten Mischung von 5 ml 0,1 N Silbernitrat, 2 ml 5 N NH_3 und 3 ml H_2O erhielt man für DDS-NOH und DDS-di-NOH je nach Konzentration graue bis schwarze Flecken.

2.2.4. Lebermikrosomen (82)

Die gewogenen Tiere wurden durch Genickschlag getötet. Sofort nach dem Entbluten wurden die Lebern herauspräpariert, in eiskaltem 0,1 M Phosphatpuffer abgekühlt und nach Abtrocknen auf Filterpapier gewogen. Die mit der Schere zerkleinerte Leber wurde im Verhältnis 1 Teil Leber und 3 Teile Phosphatpuffer in einem sehr losen Glashomogenisator vorhomogenisiert. Dann wurde in einem Kunststoffhomogenisator

(Plexiglas) homogenisiert und 20 min bei 9000 g zentrifugiert. Der 9000 g Überstand wurde sorgfältig von der oberen Fettschicht befreit und 60 min bei 78000 g in der Ultrazentrifuge (Rotor 30, 30 000 Upm) zentrifugiert. Der 78 000 g Niederschlag wurde zweimal in einem dem 9000 g Überstand entsprechenden Puffervolumen resuspendiert und erneut abzentrifugiert, um lösliche Leberproteine möglichst w-eitgehend zu entfernen. Die Mikrosomenfraktion wurde im Verhältnis 1 + 2 in Tris/KCl-Puffer suspendiert und die Proteinkonzentration gemessen. Ein Teil der Mikrosomen-Niederschläge wurde bei -25° C eingefroren und bei Bedarf aufgetaut und in Tris/KCl-Puffer suspendiert. Das Maximalalter der zu Versuchen verwendeten eingefrorenen Mikrosomen betrug 4 Wochen.

2.2.5. Erythrozyten

Erythrozyten von frisch geschlachteten Rindern wurden dreimal mit 5 Teilen Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer durch Zentrifugieren bei 3000 g gewaschen.

2.2.6. Inkubationen

Bei allen Standardinkubationen wurde nach einer Vorinkubation von 3 min bei 37° C die Reaktion durch Zugabe des Substrates gestartet. Die Substrate waren in 99% Äthanol gelöst. Die Konzentration des Äthanols im Ansatz betrug 1%. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Inkubationen unter Luft in offenen Gefäßen durchgeführt und dabei ge-

schüttelt.

2.2.6.1. NADPH-Regenerierendes System

Das für die Inkubation benötigte NADPH-regenerierende System wurde separat in 20% des Inkubationsendvolumens angesetzt und auf 37° C erwärmt. Dann wurde im Photometer an Hand der Zunahme der Extinktion bei 340 nm die Aktivität des Systems überprüft.

2.2.6.2. Inkubationen mit Mikrosomen

Standardinkubationen mit Lebermikrosomen enthielten pro ml Ansatz:

1 mg	mikrosomales Protein
0,36 µMol	NADP
5,0 µMol	Glucose-6-Phosphat
6 µMol	$MgCl_2$
0,15 U	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

in 0,05 M Trispuffer mit 0,1 M KCl, pH 7,4.
Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml 12% Trichloressigsäure je ml Ansatz gestoppt.

2.2.6.3. Inkubationen mit Erythrozyten

Die Inkubationen mit Erythrozyten enthielten pro ml Ansatz: 0,35 ml bei 3000 g zentrifugierte Erythrozyten, 0,1% Glucose in Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer. Die Reaktion wurde durch Hämolysieren der Erythrozyten in eiskaltem Wasser gestoppt.

2.2.6.4. Inkubationen mit Mikrosomen und Erythrozyten

Inkubationsmischungen mit Mikrosomen und Erythrozyten enthielten pro ml Ansatz:

0,35	ml	bei 3000 g zentrifugierte Erythrozyten
2	mg	mikrosomales Protein
0,36	µMol	NADP
5,0	µMol	Glucose-6-Phosphat
6	µMol	$MgCl_2$
0,15	U	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

in Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer.
Die Reaktion wurde durch Hämolysieren eines aliquoten Teils in eiskaltem Wasser gestoppt.

2.2.6.5. Inkubationen mit CO Gasmischungen

Diese Inkubationen wurden in geschlossenen Erlenmeyerkolben durchgeführt, die während der Inkubation mit der entsprechenden Gasmischung durchströmt wurden. Vor der Substratzugabe wurde jeweils 10 min unter der Gasmischung vorinkubiert und dann das Substrat aus einem Seitenarm zugegeben. Die Ansätze wurden während der Inkubation geschüttelt. Die Durchströmungsgeschwindigkeit betrug 100 ml pro min.

Herstellung einer Gasmischung:

Ein geeichter Kunststoffzylinder (Volumen 2,5 l), der jeweils am oberen und unteren Ende mit einer Schlauchzuführung versehen war, wurde vollständig einschließlich der Schläuche mit Wasser gefüllt und am unteren Ende mit einem

Niveauausgleichsgefäß verbunden. Dann ließ man 2,4 l CO oder N_2 durch den oberen Schlauch langsam in den Zylinder einströmen, wobei das Niveaugefäß zum Druckausgleich ständig auf Höhe des Wasserspiegels im Zylinder mitgeführt wurde. Anschließend wurden mit einer gasdichten Spritze 48 ml O_2 durch eine Membrane in den Zylinder gespritzt und der Gasraum mit Hilfe des restlichen Wassers kräftig durchmischt.

2.2.6.6. Inkubationen mit Glucuronidase und Glusulase

Die Urininkubationen mit Glucuronidase und Glusulase (= Glucuronidase + Sulfatase) wurden unter N_2 in 0,2 M Natriumacetat-Puffer (pH 5) durchgeführt. Die Konzentration der Glucuronidase betrug 3000 Fishman Einheiten pro ml Urin, auch wenn mit dem Gemisch von Glucuronidase und Sulfatase inkubiert wurde. In den Inkubationsansätzen befand sich 1 ml Urin in 4 ml Gesamtvolumen.

3. E R G E B N I S S E

3.1. Identifizierung der synthetischen Vergleichssubstanzen

3.1.1. 4-Nitro -4'-aminodiphenylsulfon

Dieses Zwischenprodukt der DDS-NOH Synthese besitzt als mögliches biologisches Oxidationsprodukt von DDS Interesse. Es ist in Substanz und in Lösung stabil.

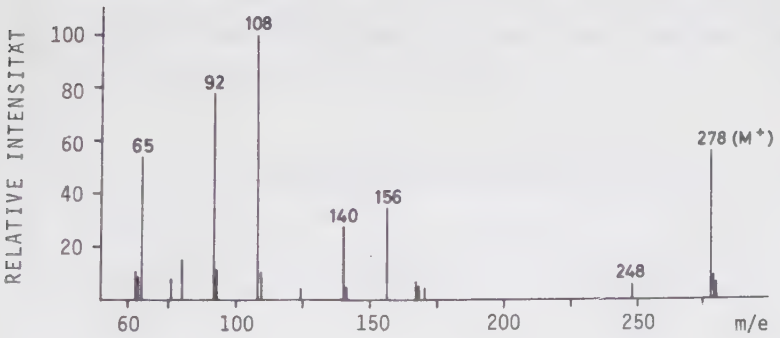


Abb. 1. Massenspektrum von 4-Nitro-4'-aminodiphenylsulfon. Gerät: LKB 9000; Beschleunigungsenergie 2,5 KV; Elektronenenergie 70 eV; Temp. 110° C.

3.1.2. 4-Hydroxylamino-4'-aminodiphenylsulfon

Die Reduktion des 4-Nitro-4'-aminodiphenylsulfon zum 4-Hydroxylamino-4'-aminodiphenylsulfon wurde im wesentlichen nach Jackson (75) durchgeführt. Jackson beschreibt

DDS-NOH als blaßgelbe Kristalle. Durch Zusatz von Mercaptoäthanol und Arbeiten mit N_2-gesättigten Lösungen gelang es, weiße Kristalle zu erhalten, die sich nach etwa einer Woche im Exsikkator in der Kälte gelb färben. In wässriger Lösung und in organischen Lösungsmitteln sind DDS-NOH und DDS-di-NOH relativ instabil. Die anfangs farblosen Lösungen färbten sich beim Aufbewahren bei Zimmertemperatur nach wenigen Minuten gelb. Am beständigsten erwies sich eine Lösung von DDS-NOH in absolut peroxydfreiem Äther. Das Hydroxylamin des Dapsons verhält sich in der Löslichkeit wie das Amin. Es ist löslich in Äthanol (etwa 25 mg/ml bei 20° C), Äther, Ketonen und Estern; schlecht löslich in Wasser, $CHCl_3$ und unlöslich in CCl_4 und Petroläther.

3.1.3. 4,4'-Dihydroxylaminodiphenylsulfon

Die kleine Ausbeute von DDS-di-NOH läßt sich auf die geringe Löslichkeit des Dinitrodiphenylsulfons in organischen Lösungsmitteln und Wasser (in diesem Fall Äthanol-Wasser) zurückführen. Nur ein kleiner Teil befindet sich während der Reduktion in Lösung. Die Löslichkeit von Dinitrodiphenylsulfon in Äthanol beträgt ca 0,2 mg/ml bei 20° C.

3.1.4. 4,4'-Bis-(p-aminobenzolsulfonyl)azoxybenzol

DDS-Azoxy erhält man als gelbes fein kristallines Produkt. Es ist in Wasser und den meisten organischen Lösungs-

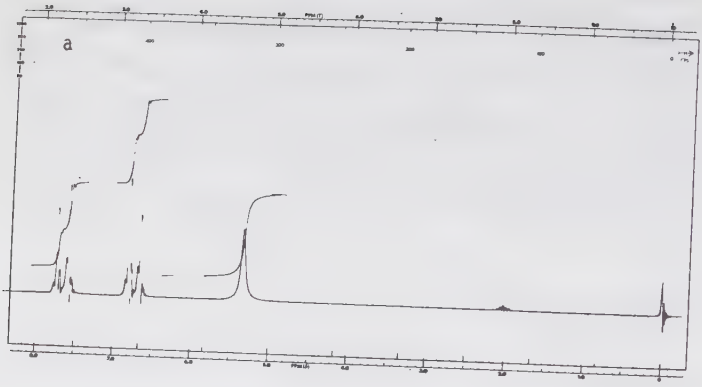
mitteln unlöslich. Es besitzt eine geringe Löslichkeit in Aceton, Äthylacetat und Äthylenglykolmonomethyläther und ist löslich in Pyridin und Dimethylsulfoxid. Von DDS-Azoxy wurde eine Elementaranalyse angefertigt. Berechnet wurde für $C_{24}H_{20}N_4O_5S_2$: C = 56.68%; H = 3,96%; N= 11,02%. Gefunden wurde: C = 57,07%; H = 4,13%; N = 11,01%.

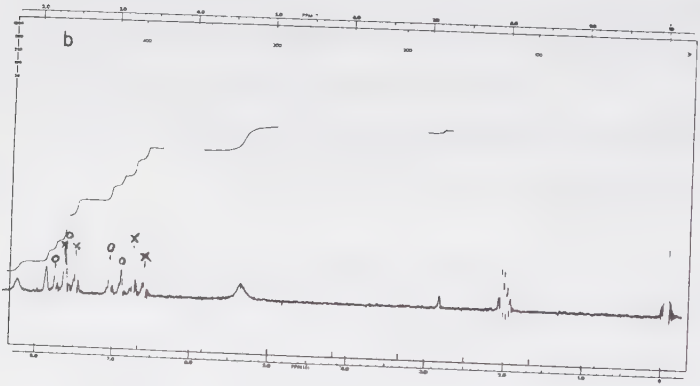
3.1.5. NMR-Spektren

Es war nicht möglich, von DDS-NOH, DDS-di-NOH und DDS-Azoxy ein Massenspektrum zu erhalten. Die Substanzen verkohlten z.T. beim Verdampfen. Eine Derivatisierung ließ sich nicht durchführen. Daher wurde zur Struktursicherung von DDS-NOH und DDS-di-NOH ein NMR-Spektrum aufgenommen. Als Vergleich wurde das NMR-Spektrum von DDS herangezogen.

In Abb. 2 sind die NMR-Spektren von DDS, DDS-NOH und DDS-di-NOH wiedergegeben. Bei δ = 2 liegen jeweils die Linien für das Lösungsmittel Aceton d_6. Der kleine Peak bei δ = 2,83 in Abb. b und c wird durch Spuren von Wasser verursacht.

Zu Abb. a: Das breite Signal bei δ = 5,35 wird durch die Protonen der Aminogruppe hervorgerufen. Für die Protonen des aromatischen Rings erhält man die Aufspaltung in zwei Doubletts, wobei das Doublett bei δ = 6,74 den der Aminogruppe benachbarten Protonen entspricht, während das nach tieferem Feld verschobene Doublett δ = 7,66 den der SO_2-Gruppe benachbarten Protonen entspricht.


a


b

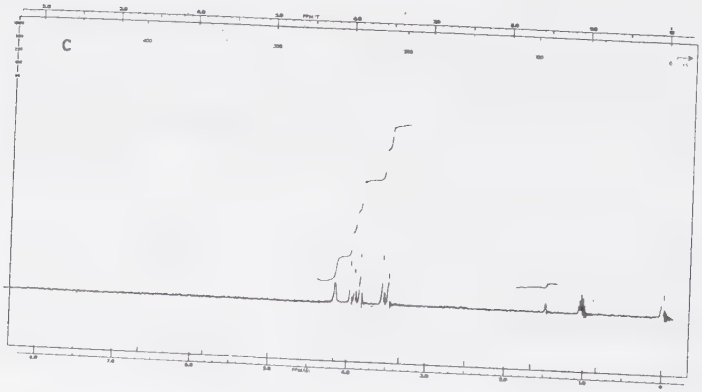
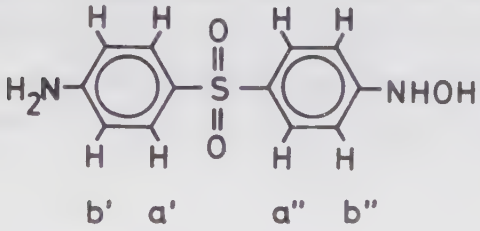

c

Abb. 2. NMR-Spektren: a) DDS, b) DDS-NOH, c) DDS-di-NOH. Frequenz 60 MHz, Lösungsmittel Aceton d_6, Temperatur 35° C, Filter 4 Hz, RF-Feld 0,025 mG, Sweep-Zeit 250 sec.
a) Sweepbreite 500 Hz, Amplitude 2,5; b) Sweepbreite 500 Hz, Amplitude 10; c) Sweepbreite 1000 Hz, Amplitude 8,0.



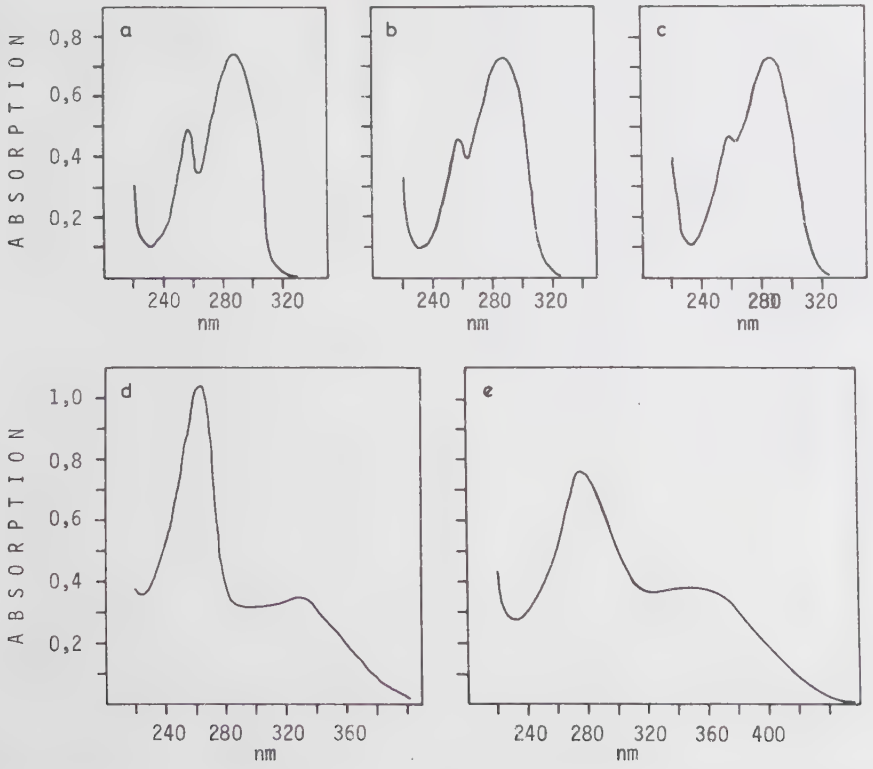
Zu Abb. b: Bei δ = 5,4 findet man das breite Signal für die Protonen der Aminogruppe wieder. Als zusätzliche Linien treten der breite Peak für die NH-Protonen der Hydroxylaminogruppe bei sehr tiefem Feld δ = 8,32 und ein Singlett für das OH-Proton bei δ = 7,92 auf. Für das unsymmetrische Molekül 4-Hydroxylamino-4'-aminodiphenylsulfon sind die Doubletts der SO_2- (a) und der NH_2-Gruppe (b) benachbarten Protonen nochmals aufgespalten. Bei δ = 7,66 finden wir 4 Linien für die a Protonen, wobei die mit O bezeichneten Peaks den Protonen a' und die mit X bezeichneten Peaks den Protonen a'' entsprechen. Für die b Protonen erhalten wir 4 Linien bei δ = 6,74, wobei die mit O bezeichneten Peaks den b' Protonen und die mit X bezeichneten Peaks den b'' Protonen entsprechen.
Zu Abb. c: Abb. c zeigt das Spektrum des symmetrischen Moleküls 4,4'-Dihydroxylaminodiphenylsulfon. Das Signal für die NH_2-Bande ist verschwunden. Bei δ = 8,32 erhalten wir

ein Singlett für die NH-Protonen und bei δ = 7,93 ein Singlett für die OH-Protonen. Die a und b Protonen sind jetzt wieder wie in Abb. 2a in zwei Doubletts aufgespalten. Ein Doublett bei δ = 7,7 für die a Protonen und ein Doublett δ = 7,04 für die b Protonen.
Der Wert für die der SO_2-Gruppe benachbarten Protonen ist in allen drei Spektren fast konstant, während der Wert für die der NH_2-Gruppe benachbarten Protonen mit zunehmenden Hydroxylanteil nach tieferem Feld verschoben ist.

3.2. UV-Absorptionsspektren von DDS und seinen möglichen Oxidationsprodukten

Die UV-Absorptionsspektren von DDS, DDS-NOH und DDS-di-NOH weisen alle drei ein Maximum bei 268-288 nm auf. Sie unterscheiden sich nur durch die Größe und eine geringe Verschiebung der Schulter bei 258 nm. DDS-NO_2 besitzt ein Maximum bei 262-264 nm, während das Maximum von DDS-Azoxy nach längeren Wellenlängen 276-277 nm verschoben ist.

Abb. 3.
a) DDS, Konz.: 0,025 uMol/ml, Lösungsmittel: Äther
b) DDS-NOH, Konz.: 0,025 uMol/ml, Lösungsmittel: Äther
c) DDS-di-NOH, Konz.: 0,025 uMol/ml, Lösungsmittel: Äther
d) DDS-NO_2, Konz.: 0,05 uMol/ml, Lösungsmittel: Äther
e) DDS-Azoxy, Konz.: 0,02 uMol/ml, Lösungsmittel: Äthylenglykolmonomethyläther.


ABSORPTION
0,8
0,6
0,4
0,2
a
b
c
240
280
320
nm
ABSORPTION
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
d
e
240
280
320
360
400
nm

3.3. Identifizierung der entstandenen Metabolite durch Dünnschichtchromatographie

Tabelle I

Chromatographische Eigenschaften von Dapson und seiner Derivaten.

Substanz	R_f in Fließmittel		
	I	II	III
DDS	0,63	0,51	0,64
DDS-NOH	0,34	0,46	0,48
DDS-di-NOH	0,15	0,36	0,35
DDS-NO_2	0,74	0,52	0,73
DDS-Azoxy	0,7	0,66	0,62
Acetyl-DDS	0,63	0,50	0,62

Fließmittel I: $CHCl_3$ + Methanol (85 + 15, V/V);

II: Aceton + Methanol + Hexan (10 + 40 + 40, V/V);

III. Äthylacetat + Isopropanol (30 + 40 + 30, V/V) + Hexan

Abb. 4: DC: Al_2O_3 neutral, F 254, Typ E. Fließmittel: $CHCl_3$ + Methanol (85 + 15, V/V).

a) Vergleichssubstanzen: 1. DDS-di-NOH, 2. DDS-NOH 3. DDS, 4. DDS-Azoxy, 5. DDS-NO_2.

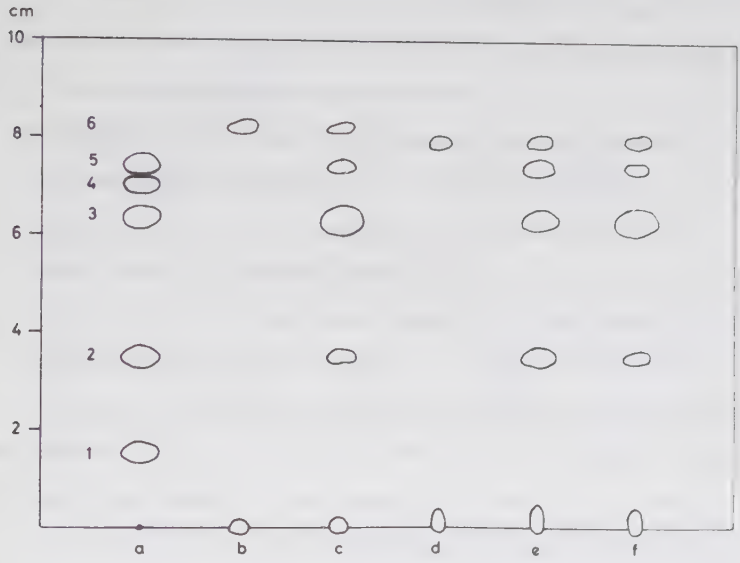
b) Ätherextrakte von Inkubationen mit Mikrosomen ohne Substrat.

c) Ätherextrakte von Inkubationen mit Mikrosomen und DDS (Standardinkubation) nach 30 min Inkubationszeit.

d) Ätherextrakt von hydrolysiertem Menschen-Urin vor DDS-Gabe.

e) Ätherextrakt von hydrolysiertem Menschen-Urin nach DDS-Gabe.

f) Ätherextrakt von hydrolysiertem Hunde-Urin nach DDS-Gabe.



Fleck Nr. 4 (DDS-Azoxy) und Nr. 5 (DDS-NO_2) waren bereits durch ihre gelbe Färbung zu erkennen. Fleck Nr. 1 (DDS-di-NOH) und Nr. 2 (DDS-NOH) färbten sich an der Luft ebenfalls nach einiger Zeit gelb.

Zu b und d: Aus Ätherextrakten von mikrosomalen Inkubationsansätzen ohne Substrat oder von Leerurin (Urin vor Dapsongabe) erhielt man auf der DC-Platte einen im UV sichtbaren Fleck nahe der Fließmittelfront (Urin: R_f = 0,795, Mikrosomen: R_f = 0,82). Außerdem blieb ein im UV sichtbarer Fleck am Startpunkt liegen.

Nach Dapsongabe bzw. Inkubation mit Dapson ließen sich mittels dieser Extraktionsmethode aus Urin und Inkubationsansätzen drei zusätzliche Flecken im UV erkennen,

die durch die entsprechenden Vergleichssubstanzen identifiziert werden konnten.

Bei einem R_f-Wert von 0,63 fand man einen Fleck, der das zugesetzte, nicht metabolisierte Substrat darstellt. Dieser Fleck ließ sich durch Ansprühen mit Ammoniumdinatriumpentacyanoaminoferrat blau, aber mit Silbernitrat-Reagenz nicht anfärben. Bei e und f war DDS der größte und im UV am stärksten sichtbare Fleck. Der Fleck bei einem R_f-Wert von 0,34 entspricht DDS-NOH. Er ließ sich durch Besprühen mit Silbernitrat-Reagenz grau bis schwarz und mit Ammoniumdinatriumpentacyanoaminoferrat violett anfärben. Da DDS-NOH relativ instabil ist, war es nicht möglich, durch Auskratzen und Rechromatographieren sauberes DDS-NOH für ein NMR-Spektrum zu erhalten.

Bei einem R_f-Wert von 0,74 trat ein weiterer Fleck auf, der DDS-NO_2 entspricht. Da die R_f-Werte von DDS-NO_2 und DDS-Azoxy nahe beieinander liegen und beide Substanzen gelb gefärbt sind, wurde der Extrakt von menschlichem Urin auf eine präparative PSC-Fertigplatte (Al_2O_3, Typ T) aufgetragen. Der gelbe Fleck wurde nach der Trennung (R_f = 0,74) ausgekratzt und mit Äthylacetat extrahiert. Nach Verdampfen des Äthylacetats ließ sich der gelbe Rückstand in Äther vollkommen lösen. (DDS-Azoxy ist in Äther unlöslich.) Anschließend wurde ein UV-Spektrum aufgenommen.

Die UV-Spektren von DDS-NO_2 und DDS-Azoxy unterscheiden sich beträchtlich. DDS-NO_2 hat ein Absorptionsmaximum bei 264 nm und eine Schulter bei 325-335 nm, während

DDS-Azoxy ein Maximum bei 276-277 nm und eine Schulter bei 335-355 nm hat. Die UV-Spektren der isolierten Substanz und des synthetisierten DDS-NO_2 waren fast identisch. Das Absorptionsmaximum der isolierten Substanz war um 2 nm nach längerer Wellenlänge verschoben, wahrscheinlich auf Grund einer Verunreinigung.

Bei einem R_f Wert von 0,15 (entsprechend DDS-di-NOH) war weder aus Urin- noch aus Inkubationsextrakten ein entsprechender Fleck auf der Dünnschichtplatte zu entdecken. Das bedeutet, daß das symmetrische Molekül Dapson nur an einer Aminogruppe oxidiert wird.

Das Oxidationsprodukt DDS-NO_2 kann sowohl enzymatisch als auch nicht enzymatisch aus DDS-NOH entstanden sein. Frisch umkristallisiertes DDS-NOH zersetzt sich bereits auf der Dünnschichtplatte an der Luft in verschiedene Produkte, unter anderem DDS-NO_2. Extrahiert man synthetisiertes DDS-NOH mit Äther aus Phosphatpuffer oder Mikrosomen, so erhält man sogar nach Einengen unter Stickstoff auf der Dünnschichtplatte einen Fleck, der DDS-NO_2 entspricht.

3.4. Methämoglobinbildung in vitro als Indikator für die N-Hydroxylierung

Oft erweist sich die Isolierung und Identifizierung von N-Oxidationsmetaboliten aromatischer Amine aus Blut oder

Urin als sehr schwierig (vergl. Uehleke, 57; Kiese, 85), da solche Metabolite oft nur in kleinen Konzentrationen gebildet werden und außerdem sehr reaktiv und instabil sind. N-Hydroxymetabolite wurden auch in vitro Ansätzen des entsprechenden Substrats mit Lebermikrosomen und einem NADPH-regenerierenden System gefunden. Fügt man diesen Inkubaten Erythrozyten hinzu, so werden durch die Oxidation des Hämoglobins auch geringe Mengen von Arylhydroxylaminen angezeigt.

3.4.1. Methämoglobinbildung in Erythrozyten durch Dapson in Gegenwart von Mikrosomen und NADPH

Abb. 5 zeigt die Methämoglobinbildung in Inkubaten mit Mikrosomen, Erythrozyten, NADPH-regenerierendem System und DDS. Nach einer Stunde waren mit Lebermikrosomen von normalen Kaninchen 20% des Gesamthämoglobins oxidiert. Mikrosomen von Phenobarbital vorbehandelten Tieren zeigten eine noch größere Aktivität: In einer Stunde wurden 55% des Gesamthämoglobins zu Methämoglobin oxidiert. In Kontrollansätzen ohne NADPH wurde kein Methämoglobin gebildet. Die Verzögerungsphase (lag-period) deutet auf die Bildung eines aktiven Metaboliten während der Inkubation hin. Ein Vergleich der Hämoglobinoxidation durch DDS und der Hämoglobinoxidation durch DDS-Acetyl, ein Derivat mit nur einer freien Aminogruppe, in diesem Inkubationssystem (Lebermikrosomen von stimulierten Tieren) zeigte, daß das Diamin nur 10 - 20% aktiver ist.

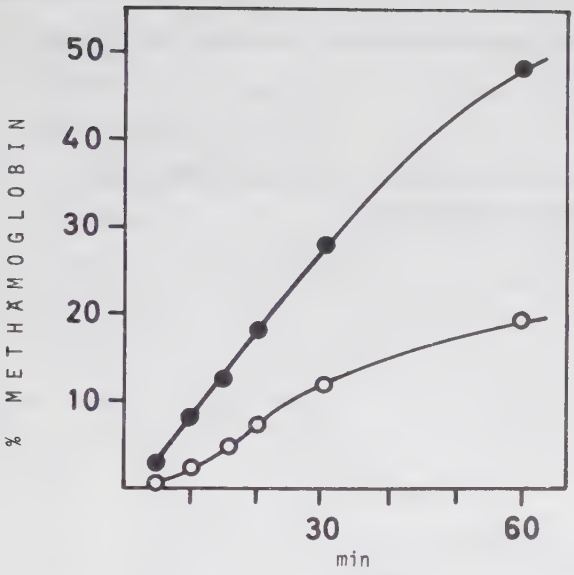


Abb.5: Inkubation von Lebermikrosomen (2 mg Prot./ml), Rindererythrozyten (0,12 g Hämoglobin/ml), NADPH-regenerierendes System, Glucose (0,1%) und Dapson (2 mM). Inkubation mit Mikrosomen von normalen Kaninchen: -O-O- ; Mikrosomen von Phenobarbital stimulierten Kaninchen: -●-●-.

Da dieser Versuch auf die Bildung eines aktiven Metaboliten hinweist (63), der Hämoglobin zu Methämoglobin oxidiert, lag es nahe, diesen aktiven Metaboliten selbst mit Erythrozyten zu inkubieren. Primäre aromatische Amine, z.B. Anilin, oxidieren oft Hämoglobin sowohl in vivo als auch in vitro, aber erst nachdem sie eine biologische Umwandlung erfahren haben. Kiese et al. (86) und Kiese (85) stellten

klar, daß Arylhydroxylamine äußerst wirksame Methämoglobinbildner sind. Ein Molekül Phenylhydroxylamin kann z.B. mehr als hundert Moleküle Hämoglobin in intakten Erythrozyten oxidieren.

3.4.2. Methämoglobinbildung in Erythrozyten durch DDS-NOH und DDS-di-NOH

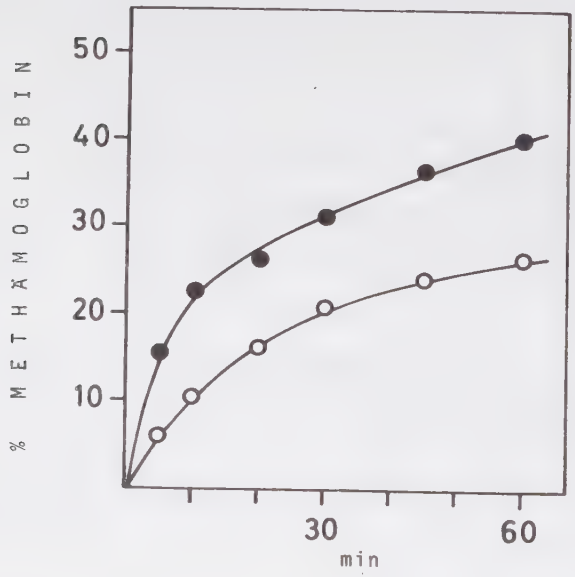


Abb. 6: Inkubation von Erythrozyten (0,12 g/ml), Glucose (0,1%) und N-Hydroxyderivaten von Dapson.
DDS-NOH (10 µM): -O-O- ; DDS-di-NOH (10 µM): -●-●- .

Die Inkubation von N-Oxidationsprodukten von DDS mit gewaschenen Erythrozyten führte zu einer beträchtlichen Methämoglobinbildung. Nach einer Stunde hatte DDS-di-NOH (10 µM) 40% des Gesamthämoglobins zu Methämoglobin oxidiert, während DDS-NOH (10 µM) mit nur einer Hydroxylamingruppe 25% Methämoglobin gebildet hatte. D.h. unter diesen Versuchsbedingungen vermag 1 Molekül DDS-NOH 190 Moleküle Hämoglobin in 60 min zu oxidieren, während 1 Molekül DDS-di-NOH sogar 280 Moleküle Hämoglobin oxidiert. Setzt man höhere Konzentrationen von N-Hydroxyderivaten ein (ab 50 µM und größer), so verschwindet dieser Unterschied.

3.5. Vergleich der analytischen Bestimmungsmethoden aromatischer Hydroxylamine am Beispiel des p-Chlorphenylhydroxylamins

Die quantitative Bestimmung eines aromatischen Hydroxylamins neben dem entsprechenden Amin aus biologischen Flüssigkeiten und Inkubaten ist oft recht schwierig, da diese Stoffe relativ instabil sind und sich in ihrem chemischen Verhalten wenig von den dazugehörigen Aminen unterscheiden. Bei einer bisher gebräuchlichen Methode (82) z.B. für die Bestimmung des N-Oxidationsproduktes von p-Chloranilin wird die N-Hydroxyverbindung mit $K_3\left[Fe(CN)_6\right]$ zur stabileren Nitrosoverbindung oxidiert (siehe: 2.2.2.3.2.). Diese läßt sich von der Ausgangssubstanz, dem Amin, durch die verschiedenen pK-Werte trennen. Die Aminoverbindung wird durch verdünnte Säuren

ausgeschüttelt, und die zurückbleibende Nitrosoverbindung wird durch Diazotieren und Kuppeln bestimmt.

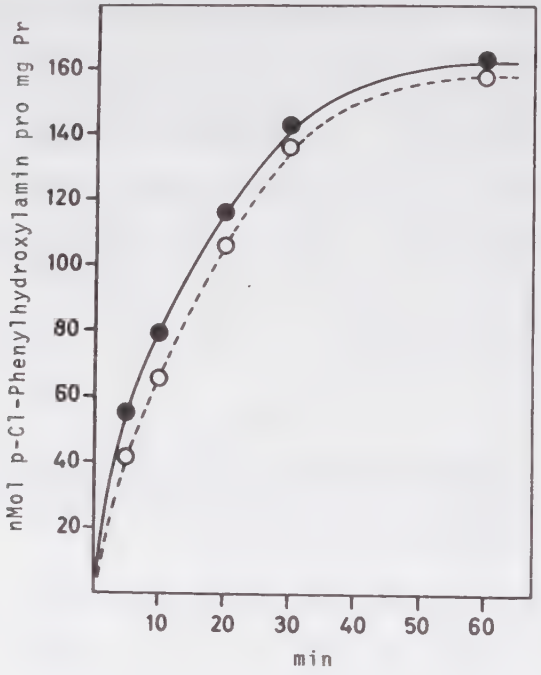


Abb. 7: Vergleich der N-Hydroxylierung von p-Chloranilin (1 mM) mit 2 verschiedenen Bestimmungsmethoden. Inkubation: 1 mg Mikrosomenprot./ml von stimulierten Kaninchen, 0,36 mM NADP, Luft.
Bestimmung von p-Chlorphenylhydroxylamin nach der Fe^{2+}-Bathophenanthrolin-Komplex Methode: -O-O- ;
Bestimmung von p-Chlorphenylhydroxylamin als p-Chlornitrosobenzol: -●-●- .

Da das Dapsonmolekül zwei Aminogruppen besitzt, aber nur eine Aminogruppe N-hydroxyliert wird, konnte dieser Weg

nicht beschritten werden. Das Ausgangssubstrat Dapson und der an einem Stickstoffatom oxidierte Metabolit lassen sich durch Verteilung zwischen organischen Lösungsmitteln und verdünnten Mineralsäuren nicht trennen. Daher mußte DDS-NOH in Gegenwart von DDS bestimmt werden. Es wurden die Reduktionsäquivalente der Hydroxylaminverbindung über den Fe^{2+}-Bathophenanthrolin-Komplex gemessen. Um außer den Eichkurven noch eine Überprüfung der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit dieser Methode zu erhalten, wurde aus dem gleichen Inkubationsansatz mit dem Substrat p-Chloranilin das entstehende p-Chlorphenylhydroxylamin nebeneinander mit beiden Methoden gemessen.

Abb. 7 zeigt die Bildung des p-Chlorphenylhydroxylamins aus p-Chloranilin in Abhängigkeit von der Zeit. Die mit der Fe^{2+}-Bathophenanthrolin-Komplex Methode erhaltenen Werte lagen um 2-8% niedriger als die nach Diazotierung und Kupplung von p-Chlornitrosobenzol erhaltenen Werte.

3.6. Untersuchungen über die N-Hydroxylierung von Dapson durch Lebermikrosomen

3.6.1. Zeitabhängigkeit der Reaktion

Gewaschene Kaninchenlebermikrosomen von Phenobarbital vorbehandelten Tieren katalysierten die N-Hydroxylierung von Dapson in Gegenwart von O_2 und einem NADPH-regenerierendem System. Die Reaktion verlief in den ersten 5-8 min an-

nähernd linear mit einer Geschwindigkeit von 3-4 nMol DDS-NOH pro mg Protein und min (s. Abb. 8). Bei kleineren Konzentrationen von Mikrosomen in den Inkubationsansätzen blieb die Reaktionsgeschwindigkeit über einen längeren Zeitraum konstant. Nach etwa 30 - 40 min erreichte die Konzentration des gebildeten DDS-NOH ein Plateau und nahm bei einigen Ansätzen sogar geringfügig wieder ab (s. auch Abb. 13). Der Grund für die Abnahme dürfte die geringe Stabilität des DDS-NOH in den Inkubationsansätzen sein. Daher wurde bei den folgenden Versuchen (außer 3.6.5.) die Bildung von DDS-NOH immer nach 10 min Inkubationszeit gemessen. In Kontrollversuchen ohne NADPH-regenerierendes System konnte kein DDS-NOH nachgewiesen werden.

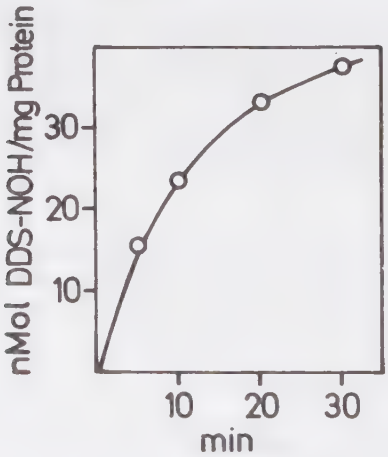


Abb. 8: N-Hydroxylierung von Dapson in Abhängigkeit von der Zeit. Inkubation: 1 mM Dapson, 1 mg Mikrosomenprotein pro ml von Phenobarbital vorbehandelten Kaninchen, 0,36 mM NADP, Luft.

3.6.2. Substratabhängigkeit der Reaktion

Bei Inkubationen mit verschiedenen Substratkonzentrationen (0,1 - 1 mM DDS) bei gleichen Protein- und NADPH-Konzentrationen erreichte man Substratsättigung bei 1 mM DDS (Abb. 9).

Die Äthanolkonzentration im Ansatz wurde stets konstant gehalten. Eine höhere Konzentration als 1 mM DDS konnte nicht eingesetzt werden, da auf Grund der geringen Löslichkeit von DDS in Äthanol die Äthanolkonzentration im Ansatz hätte erhöht werden müssen. Durch Zusatz von Äthanol wird aber die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflußt.

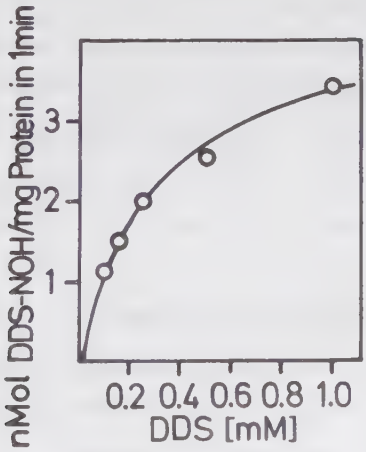


Abb. 9: Der Einfluß der Substratkonzentration auf die N-Hydroxylierung von Dapson. Inkubation: 1 mg Mikrosomenprotein/ml von stimulierten Tieren, 0,36 mM NADP, Inkubationszeit 10 min, Luft.

Trotz der geringen Löslichkeit von DDS in Wasser (87) stieg die Geschwindigkeit der mikrosomalen N-Hydroxylierung

von DDS bis zu einer Konzentration von 1 mM DDS an, wahrscheinlich auf Grund der besseren Löslichkeit von DDS in den lipophilen Membranen des endoplasmatischen Retikulums. Bei dem in Abb. 9 dargestellten Versuch betrug die scheinbare Michaelis Konstante etwa $2{,}5 \times 10^{-4}$ M.

3.6.3. Der Einfluß der mikrosomalen Proteinkonzentration auf die N-Hydroxylierungsgeschwindigkeit

Abb. 10 zeigt die Inkubation von Dapson mit mikrosomalem Protein unter Standardbedingungen (1 mM DDS, 0,36 mM NADPH-System) aber mit steigender Proteinkonzentration. Bei einer Konzentration von 2 mg Protein pro ml Ansatz erreichte die Reaktionsgeschwindigkeit ein Maximum. Bei höherer Proteinkonzentration nahm die Reaktiongeschwindigkeit wieder ab. Das ist wahrscheinlich auf eine ungenügende Sättigung mit NADPH zurückzuführen. D.h. das Angebot an reduzierenden Protonen ist hier der begrenzende Schritt. Die NADPH Konzentration kann durch verschiedene Faktoren vermindert werden: Entweder durch mit der Proteinkonzentration steigende NADPH Oxidation oder durch NADPH-verbrauchende Lipidperoxidation, die wiederum durch N-Oxidationsprodukte beeinflußt werden.

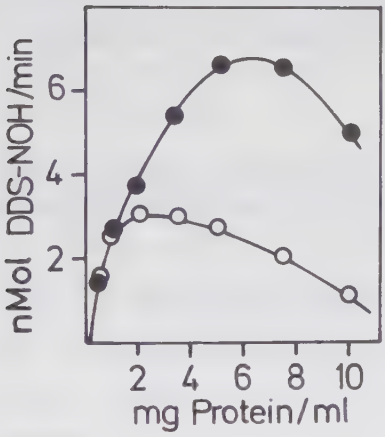


Abb. 10: Der Einfluß der mikrosomalen Proteinkonzentration auf die N-Hydroxylierungsgeschwindigkeit.
Inkubation: 1 mM DDS, 10 min Inkubationszeit, Luft.
0,36 mM NADP konstant: -O-O- ; 0,36 mM NADP pro mg Protein. (hier wurden alle Bestandteile des NADPH-Systems und Protein im gleichen Verhältnis verändert): -●-●- .

Erhöhte man die Konzentration des NADPH-regenerierenden Systems im gleichen Verhältnis wie die mikrosomale Proteinkonzentration, bezogen auf Standardbedingungen, so nahm die Reaktionsgeschwindigkeit bis zu einer Konzentration von 5 mg Protein pro ml Inkubat zu und sank dann erst ab. Bezieht man die maximale Reaktionsgeschwindigkeit auf 1 mg Protein pro ml Ansatz, so ist die Geschwindigkeit bei geringer Proteinkonzentration (0,5 mg/ml) am größen und nimmt mit steigender Proteinkonzentration - bei gleichem

NADPH-Gehalt - sehr schnell, und mit steigender Proteinkonzentration - bei entsprechend erhöhtem NADPH-Gehalt - langsam ab.

3.6.4. Mikrosomale N-Hydroxylierung von Dapson in Abhängigkeit von der NADPH-Konzentration und vom pH-Wert.

Abb. 11 zeigt die Inkubation von DDS mit steigender Konzentration des NADPH-regenerierenden Systems. Wir fanden eine deutliche Abhängigkeit der N-Hydroxylierungsgeschwindigkeit von der NADPH Konzentration; bei einer Konzentration von 0,5 mM NADPH war das System gesättigt. Die Reaktionsgeschwindigkeit nahm auch bei größerem NADPH-Gehalt im Ansatz nicht mehr zu.

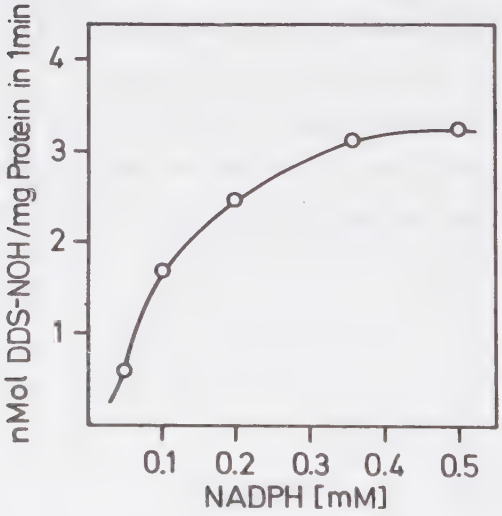


Abb. 11: Der Einfluß von verschiedenen NADP-Konzentrationen (NADPH-regenerierendes System) auf die mikrosomale N-Hydroxylierung von Dapson. Inkubation: 1 mg Prot./ml von stimulierten Tieren, 1 mM DDS, Inkubationszeit 10 min, Luft.

Bei der Inkubation von Dapson unter Standardbedingungen, aber bei verschiedenen pH-Werten, fanden wir eine für den Reaktionstyp typische pH-Abhängigkeit mit einer maximalen Aktivität bei pH 7,2 - 7,4 (Abb. 12).

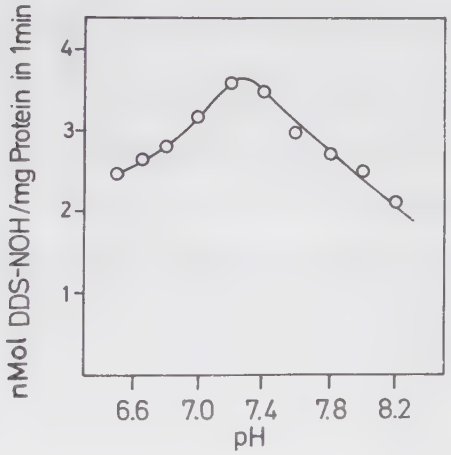


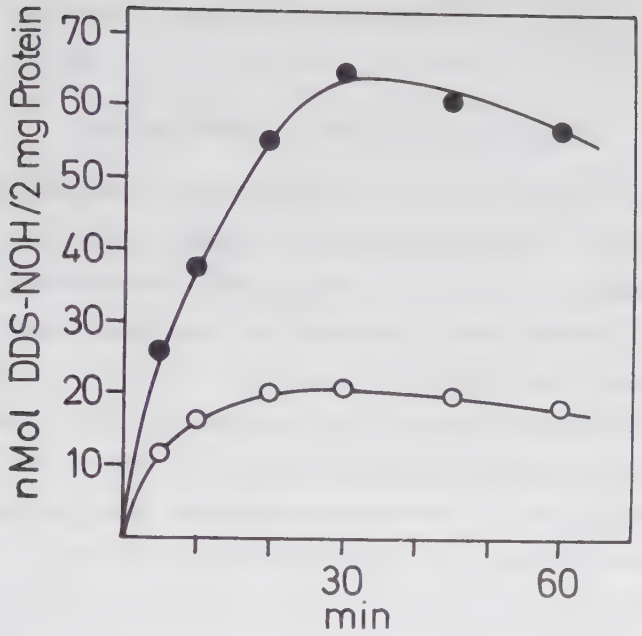
Abb. 12: Der Einfluß des pH-Wertes auf die N-Hydroxylierung von Dapson. Inkubation: 1 mg Prot./ml von stimulierten Kaninchen, 1 mM DDS, 0,36 mM NADP, Inkubationszeit 10 min, Luft.

3.6.5. Die N-Hydroxylierung von Dapson durch Mikrosomen von normalen und Phenobarbital vorbehandelten Tieren

Wie wir bereits in Versuch 3.4.1. beobachteten, war im Inkubationssystem aus Mikrosomen, NADPH-System, Erythrozyten und DDS die Methämoglobinbildung in Gegenwart von Mikrosomen stimulierter Tiere bedeutend größer als in Gegenwart von Mikrosomen normaler Tiere.

Die Verabreichung von zahlreichen, besonders von lipophilen Fremdstoffen führt bei Tieren zu einer Stimulierung der mikrosomalen Oxidation in der Leber (88,89). Die Steigerung der Oxidationsrate in der Leber beruht auf mehreren Vorgängen: Lebervergrößerung, Vermehrung des endoplasmatischen Retikulums (Mikrosomenfraktion) und eine höhere spezifische Aktivität der isolierten Mikrosomen (82). Die höhere spezifische Aktivität der Mikrosomen auch für N-Hydroxylierungsreaktionen wird überwiegend durch eine Vermehrung des Sauerstoff aktivierenden Cytochroms P-450 erklärbar.

Abb. 13: Stimulierung der Dapson N-Hydroxylierung. Inkubation: 2 mg Prot./ml, 1 mM DDS, 036 mM NADP, Luft. N-Hydroxylierung von DDS durch Lebermikrosomen von normalen Tieren: -O—O-; von Phenobarbital vorbehandelten Tieren: -●—●-.



Durch Phenobarbital-Vorbehandlung von Versuchstieren läßt sich z.B. die Geschwindigkeit der mikrosomalen N-Hydroxylierung von Anilin und ringsubstituierten Anilinen steigern (90,91,92). Bei Kaninchen steigt nach Phenobarbital-Vorbehandlung der Gehalt an Cytochrom P-450 besonders stark, bis auf das Dreifache, an.

Auch bei der N-Hydroxylierung von Dapson durch Lebermikrosomen von normalen und Phenobarbital vorbehandelten Kaninchen zeigte sich eine deutliche Differenz in der N-Hydroxylierungskapazität. Die N-Hydroxylierungsgeschwindigkeit von Dapson lag mit Mikrosomen von Phenobarbital vorbehandelten Kaninchen bis zu dreimal höher als mit Mikrosomen von Kontrollkaninchen und entsprach etwa dem

Anstieg des Cytochroms P-450 (von 1,5 nMol/mg auf 3,9 nMol/mg Protein).

3.6.6. Die Hemmung der Dapson N-Hydroxylierung

Da CO mit dem reduzierten Cytochrom P-450 in Wechselwirkung tritt und einen Komplex bildet, der eine starke Absorptionsbande bei 450 nm aufweist, nahm man an, daß durch CO verschiedene Cytochrom P-450 abhängige Oxidationsreaktionen gehemmt werden.

Die Hemmung einer mikrosomalen Hydroxylase wurde zuerst von Ryan und Engel (93) beschrieben. Sie beobachteten die Hemmung der C_{21}-Hydroxylase von Steroiden in Nebennierenmikrosomen bei Inkubation in 90% CO und 10% O_2. Kampffmeyer und Kiese (94) fanden, daß die C-Hydroxylierung von Anilin und die Desalkylierung von N-Äthylanilin durch CO gehemmt wurde, die N-Oxidation von Anilin und N-Äthylanilin jedoch nicht.

Bei einer Standardinkubation von DDS mit Lebermikrosomen in einer Atmosphäre von 80% CO und 20% O_2 fanden wir keinen Unterschied in der N-Hydroxylierungsgeschwindigkeit von DDS gegenüber einer Inkubation unter Luft. Wurde der Partialdruck des Sauerstoffs in der Gasphase herabgesetzt (95) und in einer Mischung von 98% N_2 und 2% O_2 inkubiert, so nahm die Bildung von DDS-NOH gegenüber den Kontrollansätzen unter Luft nur geringfügig (ca 10%) ab. (Inkubationszeit stets 10 min). Dieses Gasgemisch (98% N_2, 2% O_2) wurde als Kontrollansatz verwendet und mit der Inkubation in einer Atmosphäre von 98% CO und 2%

O_2 verglichen. Im Vergleich mit diesen Bedingungen war die N-Hydroxylierung von DDS in Ansätzen mit einem Gemisch von 98% CO und 2% O_2 um ca. 50% gehemmt.

Metyrapon hemmt Cytochrom P-450 Funktionen in Mikrosomen auf Grund seiner eigenen Affinität (96). Abb. 14 zeigt die Hemmung der N-Hydroxylierung von Dapson mit steigender Konzentration von Metyrapon. Metyrapon erwies sich als starker Hemmstoff der Dapson N-Oxidation. Bei gleicher Konzentration von Hemmstoff (1 mM) und Substrat (1 mM) fanden wir ca. 70% Hemmung der DDS N-Hydroxylierung. Selbst bei einer Konzentration von nur 0,05 mM des Hemmstoffs wurde die Reaktion um über 40% herabgesetzt.

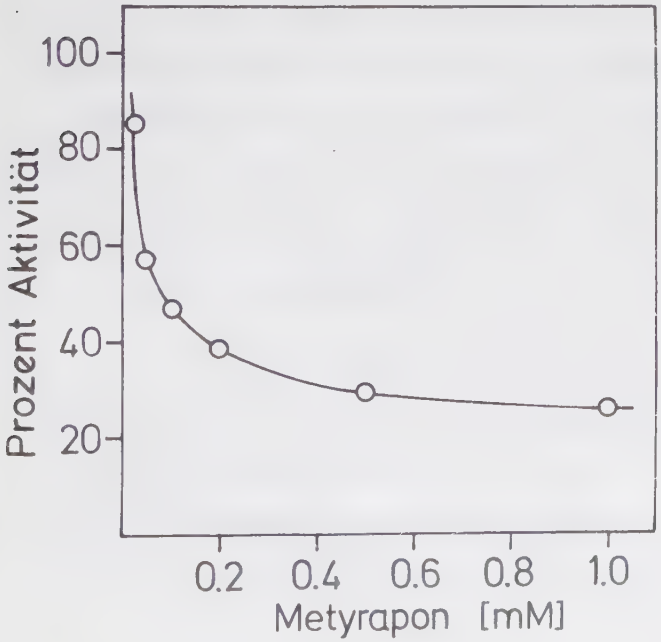


Abb. 14: Hemmung der N-Hydroxylierung von Dapson durch Metyrapon. Inkubation: 1 mg Prot./ml von stimulierten Kaninchen, 1 mM DDS, 0,36 mM NADP, Inkubationszeit 10 min, Luft. Abszisse: Konzentration des Hemmstoffs in mM; Ordinate: Prozentuale spezifische Aktivität gegenüber Kontrollen ohne Hemmstoff. Substrat und Hemmstoff wurden gleichzeitig zugegeben.

3.7. N-Hydroxylierung von Dapson in vivo

3.7.1. Dapson Metabolismus in Hunden

Fünf weibliche Beagle Hunde erhielten 50 mg DDS /kg oral in Gelatinekapseln. In bestimmten Zeitabständen wurde aus einer Vene Blut entnommen und Urin durch Katheterisieren gewonnen oder über Nacht aufgefangen.

Die Plasmaspiegel von freiem DDS stiegen in den ersten 5 - 10 Stunden schnell an und nahmen dann langsam wieder ab. Der Hund "D_3" erreichte die maximalen Plasmawerte erst nach 12 - 14 Stunden; wahrscheinlich hatte er zuvor unkontrolliert Futter aufgenommen. Die maximalen Plasmakonzentrationen von freiem DDS lagen zwischen 20 und 30 µg/ml. Sogar nach 48 Stunden betrugen die Plasmawerte noch zwischen 4 - 8 µg/ml.

Der Anstieg von Methämoglobin im Blut verlief etwa parallel zu den Plasmakonzentrationen von DDS und erreichte maximal 8 - 13% (s.Tab. II). Die Methämoglobinspiegel fielen aber schneller wieder ab als die Plasmaspiegel des DDS. Nach 24 Stunden waren die Methämoglobinwerte auf 1 - 6%

des Gesamthämoglobins abgesunken. Nach 48 Stunden war kein erhöhter Methämoglobingehalt mehr nachzuweisen. Die Ausscheidung von Gesamt-DDS nahm in den ersten 20 Stunden (bezogen auf mg DDS pro Stunde) kontinuierlich zu (s.Abb. 15). Bei den 5 Versuchshunden wurden in den 24 Stunden nach DDS Gabe 5 - 8,5% der Gesamtdosis als freies DDS im Urin bestimmt; 10 - 17% lagen als säurelabiles DDS vor und etwa weitere 6% wurden noch nach Säurehydrolyse (2 N HCl bei 100° C) freigesetzt. Nach 48 Stunden wurden 10 - 11% der Dosis als freies DDS, 25 - 30% als säurelabiles DDS und 9 - 15% als säurehydrolysierbares DDS im Urin gefunden. Die Gesamtausscheidung von DDS in 48 Stunden betrug 45 - 55% der verabreichten Dosis; nach 48 Stunden wurden aber noch weiter kleinere Mengen von DDS ausgeschieden.

Die Ausscheidung von freiem und konjugierten DDS-NOH in denselben Hunden betrug in 24 Stunden 3 - 5,5% und in 48 Stunden 7 - 9%. Weniger als 1% der verabreichten Dapson dosis war freies DDS-NOH. Bei den Hunden "B 14" und "B 15" konnte kein freies DDS-NOH gemessen werden. Es wurde nur freies DDS-NOH gefunden, wenn der pH des Urins niedrig (unter pH 7) und die Konzentration der DDS-Konjugate hoch waren. Beträgt der pH des Urins mehr als 7, so wird DDS-NOH zu DDS-Azoxy oder DDS-NO_2 oxidiert und kann nach der verwendeten Methode nicht mehr bestimmt werden.

Die Identifikation des DDS-NOH nach Hydrolyse des Urins wurde nach 2.2.3. durchgeführt und ist unter 3.3. beschrieben.

Tab. 2: Ausscheidung von Dapson (50 mg/kg, oral) und seiner Metabolite im Urin von Hunden als Prozent der Gesamtdosis und maximale Methämoglobinkonzentrationen in Prozent des Gesamthämoglobins

Hund NR.	D D S						D D S - N O H				Summe		Max. Hb. III
	frei		säure-labil		säurehydrolysierbar		frei		säure-labil				
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	
D_3	6,6		16,8		-		0,08		3,8				9
B_{15}	7,9		14,8		-		0		5,5				12
B_{11}	8,4		10,5		-		0,05		4,8				8
B_{14}	5,1	10,6	13,2	25,7	5,7	8,7	0	0	3,6	7,5	27,6	52,5	11
B_{11}	5,8	10,3	16,6	29,3	6,1	14,1	0,28	0,43	3,4	8,2	32,2	62,2	13

Abb. 15 zeigt am Beispiel des Hundes "B_{11}" die Plasmaspiegel und die dazugehörenden Methämoglobinkonzentrationen. Dazu wurde gleichzeitig die Ausscheidung von DDS und DDS-NOH im Urin kumulativ in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen.

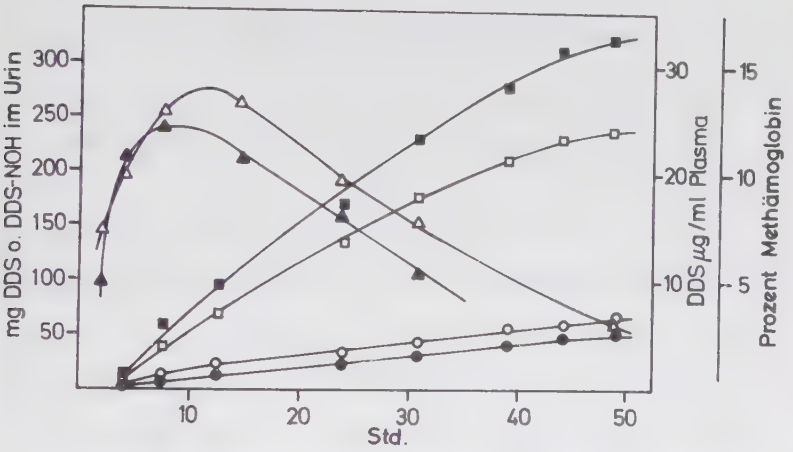


Abb. 15: Plasmaspiegel von freiem DDS, Methämoglobinkonzentration und kumulative Ausscheidung von Dapson und seiner Metabolite bei Hunden. Orale Gabe von 50 mg/kg DDS in einer Kapsel.
Plasmaspiegel von freiem DDS: -△-△-;
Methämoglobinkonzentration (in Prozent der Gesamthämoglobinkonzentration): -▲-▲-;
kumulative Ausscheidung im Urin:
freies und säurelabiles DDS-NOH: -○-○-;
freies DDS: -●-●-;
freies und säurelabiles DDS: -□-□-;
freies, säurelabiles und säurehydrolisierbares (= gesamt) DDS: -■-■-.

Nach 48 Stunden wurden nur etwa 55 - 65% der gegebenen Dosis in Form von DDS und DDS-NOH wieder ausgeschieden; in den folgenden Tagen wurden noch weitere kleine Mengen im Urin nachgewiesen. Das Verhältnis der DDS nur DDS-NOH Ausscheidung änderte sich aber nicht wesentlich.

3.7.2. Dapson Metabolismus beim Menschen

Probanden erhielten 200 mg Dapson oral in einer Gelatinekapsel. Das Gewicht der Versuchspersonen betrug zwischen 55 und 90 kg. Das entspricht einer Dosis von 2,2 - 3,6 mg DDS pro kg. Während 24 - 72 Stunden wurde in bestimmten Zeitabständen Blut entnommen und Urin gesammelt.

Die Plasmakonzentrationen von freiem DDS erreichten nach 5 - 8 Stunden ihr Maximum von 1,8 - 3,0 µg/ml (s.Abb. 16). Nach 70 Stunden konnte man noch 0,5 - 1 µg DDS pro ml Plasma nachweisen. Die Methämoglobinkonzentrationen erreichten keine höheren Werte als 4 - 5% des Gesamthämoglobins mit Ausnahme des Probanden VII; hier betrug die maximale Methämoglobinkonzentration 15%, auch machte sich eine leichte Cyanose bemerkbar. Wahrscheinlich lag ein geringer Enzymmangel bei der Versuchsperson vor.
Abb. 16 zeigt die Plasmawerte von freiem DDS und die gleichzeitige kumulative Ausscheidung von DDS und seiner Metabolite bei einem Freiwilligen.
Die Ausscheidung von unkonjugiertem DDS-NOH war nur gering; 1 - 3,5% der Gesamtdosis von verabreichtem DDS

wurden in den ersten 24 Stunden in Form von DDS-NOH gefunden. Dagegen erreichte die Ausscheidung von konjugiertem DDS-NOH (hydrolysiert mit 1 N HCl bei Zimmertemperatur) 6 - 20% in der gleichen Zeit. Während 72 Stunden wurden 4 - 7% freies und 25 - 33% konjugiertes DDS-NOH im Urin bestimmt (s.Tab. 3).

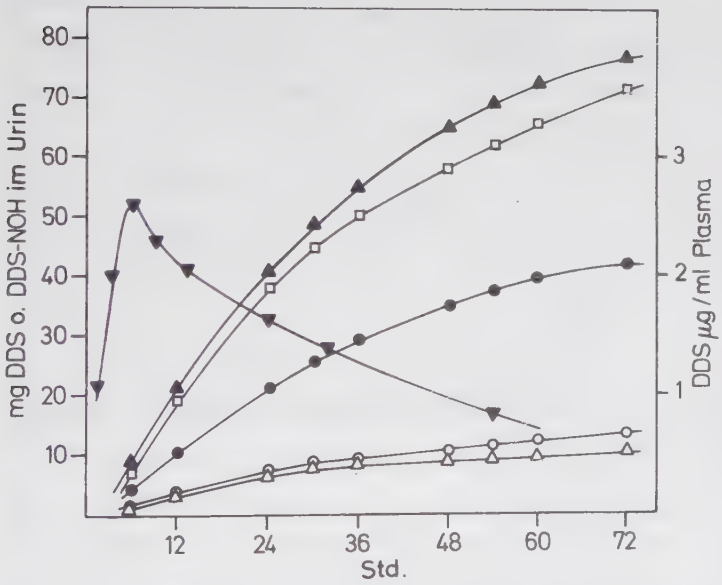


Abb. 16: Plasmaspiegel von freiem DDS und kumulative Ausscheidung von DDS und seiner Metabolite im Urin beim Menschen. Versuchsperson Nr. VI der Tab. 3, 75 kg. Orale Einnahme von 200 mg DDS in einer Kapsel.
Plasmaspiegel von freiem DDS: -▼-▼- ;
kumulative Ausscheidung im Urin:
freies DDS-NOH: -△-△- ;
freies und säurelabiles DDS-NOH: -▲-▲- ;
freies DDS: -○-○- ;
freies und säurelabiles DDS: -●-●- ;
freies, säurelabiles und säurehydrolysierbares (= gesamt) DDS: -□-□-.

Tab. 3: Ausscheidung von Dapson (200 mg oral) und der Metabolite im Urin beim Menschen in Prozent der Gesamtdosis.

Versuchsperson Nr.		DDS						DDS - NOH				Summe	
		frei		säurelabil		säurehydrolysierbar		frei		säurelabil			
		24h	72h	24h	72h	24h	72h	24h	72h	24h	72h	24h	72h
I,	w,55kg	5,6		8,2		9,6		2,5		20,5		46,6	
II,	m,90kg	3,5		7		11,5		1,25		16,1		39,4	
III,	m,70kg	2,5		9,1		15,3		0,9		6,3		33,3	
IV,	m,84kg	3,6		12,3		15,3		1,4		6		38,7	
V,	m,78kg	3,5	7,7	10,6	18	8,7	15	2,2	5,5	16,6	25,8	41,6	72
VI,	m,75kg	3,5	6,6	7,1	14,6	8,2	15,1	3	5	17	32,2	38,8	74,5
VII,	m,55kg	5,6	9,2	7,3	12,7	8	12,4	3,4	7,2	19,5	32,6	43,8	74,1
VIII,	m,70kg	2,4	5,8	4,5	10,2	13,7	27	1,3	4,1	15,5	30,5	37,4	77,6

Nach 72 Stunden wurden 6 - 10% als freies DDS bestimmt; 10 - 18% lagen als säurelabiles DDS vor und weitere 12 - 15% konnten nach Säurehydrolyse mit 2 N HCl im kochenden Wasserbad gefunden werden.

Die Gesamtausscheidung von DDS und seiner Metabolite im Urin betrug in 72 Stunden 72 - 78% der verabreichten Dosis.

Nach Inkubation einzelner Urinproben mit β-Glucuronidase unter Stickstoff wurden etwa 3 - 8% mehr DDS-NOH (bezogen auf die DDS-NOH Ausscheidung) als nach Säurehydrolyse bei Zimmertemperatur gefunden.

Durch Inkubation der gleichen Urinproben mit Glusulase wurden etwa noch 5 - 10% mehr DDS-NOH (bezogen auf die DDS-NOH Ausscheidung) als nach Inkubation mit β-Glucuronidase freigesetzt.

Im Urin von Menschen wurde also nach oraler Dapsongabe bei einigen Probanden sogar mehr DDS-NOH (freies und konjugiertes) als gesamtes DDS ausgeschieden (s.Tab. 3, Versuchsperson Nr. I,VI, VII). Das bedeutet, daß mehr als die Hälfte des gesamten ausgeschiedenen Dapsons (DDS, Metabolite und Konjugate) in Form von N-Hydroxydapson vorlag. Die Ausscheidung von DDS-NOH bei den Versuchspersonen Nr. III und IV war innerhalb von 24 Stunden relativ gering (7%), dafür lag die Ausscheidung von DDS verhältnismäßig hoch.

Es war nicht möglich, DDS-NOH nach Säurehydrolyse bei 100° C zu bestimmen. Die gemessenen Extinktionswerte nach heißer

Hydrolyse waren viel geringer als die nach Säurehydrolyse bei Zimmertemperatur gemessenen Werte. Als Kontrolle wurde jeweils Urin vor Einnahme von Dapson gewonnen und analog nach dem gleichen Analysengang verarbeitet.
Die Kontrollurine ergaben nach der Hydrolyse im kochenden Wasserbad bei der anschließenden analogen DDS-NOH Bestimmung eine gewisse Extinktion bei 535 nm, so daß die Werte für DDS-NOH nicht mehr zuverlässig bestimmt werden konnten. Die starke Abnahme nach Hydrolyse in der Hitze kommt durch Zersetzung von DDS-NOH zustande.
Die Identifikation von DDS-NOH vor und nach Hydrolyse des Urins wurde nach 2.2.3. durchgeführt und ist unter 3.3. beschrieben.
Von jeder Versuchsperson wurde außerdem 1 Tag vor und unmittelbar vor der Dapsoneinnahme jeweils der Leerurin untersucht. Der Leerurin wurde vor und nach Säurehydrolyse mit Äther extrahiert, auf einer Dünnschichtplatte chromatographiert und auf reduzierende in Äther extrahierbare Substanzen untersucht, um Störungen durch unbekannte Stoffe zu vermeiden. Bei den Versuchen mit Hunden erwies sich diese Überprüfung als nicht notwendig, da Hunde Standard-Trockenfutter erhielten.

3.8. Methämoglobinbildung durch Urin von Menschen nach Dapsongabe

Um außer dem dünnschichtchromatographischen Nachweis von DDS-NOH und der Bestimmung des DDS-NOH mittels der Fe^{2+}-

Bathophenanthrolinmethode noch einen weiteren Beweis für die Ausscheidung von N-Hydroxydapson im Urin des Menschen zu erhalten, wurde Urin von Versuchspersonen nach Gabe von Dapson mit Erythrozyten inkubiert und die Methämoglobinbildung gemessen.

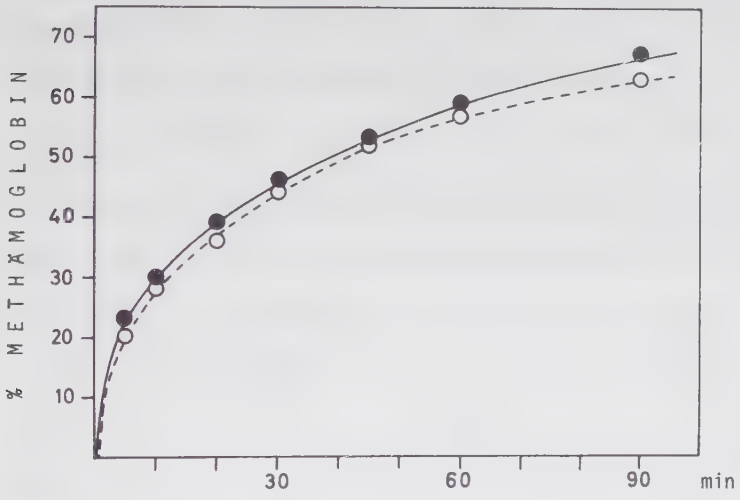


Abb. 17: Methämoglobinbildung in Inkubationen von Erythrozyten mit DDS-NOH enthaltendem Urin und mit Urin, dem synthetisches DDS-NOH zugefügt wurde.
Ansatz: DDS-NOH enthaltender Urin nach Dapsongabe (Konzentration im Ansatz nach chemischer Bestimmung: 5×10^{-5} M) 0,12 g Hämoglobin/ml in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer, 0,1% Glucose, Luft: -O-O-; Zugabe von 5×10^{-5} M DDS-NOH zu Kontrollurin, 0,12 g Hämoglobin/ml in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer, 0,1% Glucose, Luft: -●-●- ;

Der eingefrorene Urin wurde aufgetaut und hydrolysiert (1 N HCl bei Zimmertemperatur) und anschließend DDS-NOH gemessen. Nach der Bestimmung von DDS-NOH wurde ein weiterer Teil dieses Urins mit HCl hydrolysiert und dann mit NaOH auf pH 7 neutralisiert. Dadurch wurde eine erhöhte Ionenkonzentration im Urin durch Abpuffern mit 50% Natriumacetat vermieden. Ein aliquoter Teil dieses Urins wurde mit gewaschenen Rindererythrozyten und Glucose inkubiert. Der Urinanteil war so berechnet, daß die Endkonzentration von gemessenem DDS-NOH im Inkubationsansatz 5×10^{-5} M betrug. Zum Vergleich wurden Erythrozyten und das selbe Volumen von analog behandeltem Leerurin mit der gleichen Konzentration von synthetisiertem, frisch umkristallisierten DDS-NOH inkubiert.

Die Abb. 17 zeigt die Methämoglobinbildung in Erythrozyten durch DDS-NOH und DDS-NOH-haltigen Urin. In beiden Ansätzen wurde Hämoglobin mit fast gleicher Geschwindigkeit oxidiert. Nach einer Stunde enthielten die Inkubate von Erythrozyten und DDS-NOH enthaltendem Urin 57% Methämoglobin und die Kontrollansätze in der gleichen Zeit 59% Methämoglobin.

4. DISKUSSION

4.1. Methämoglobinbildung durch Dapson

Die hauptsächlichen toxischen Nebenwirkungen bei der Therapie mit Dapson sind Methämoglobinbildung und Anämien. In vitro ändert Dapson ebenso wie andere aromatische Amine den Oxidationszustand der Erythrozyten nicht. Im Körper dagegen oxidieren Arylamine und Dapson den roten Blutfarbstoff. Die Methämoglobinbildung durch die bisher untersuchten primären aromatischen Amine wurde überwiegend durch die N-Hydroxy-Metaboliten verursacht (57,63,69).

Die Isolierung und Identifizierung solcher N-Hydroxy-Metabolite von Fremdstoffen aus Blut und Urin erwies sich oft als schwierig und nicht erfolgreich, da solche Metabolite z.T. in sehr kleinen Konzentrationen vorliegen und sehr reaktiv und instabil sind (57,85,97). Die Bildung von N-Oxidationsprodukten von aromatischen Aminen wurde in Inkubaten von Lebermikrosomen und NADPH gefunden. Auch kleine Mengen dieser N-Hydroxy-Metabolite in solchen Inkubaten können durch anwesende Erythrozyten an Hand der Oxidation von Hämoglobin leicht erkannt werden (58). Bei der Inkubation von Dapson mit Lebermikrosomen, NADPH, und Erythrozyten wurde die Bildung von Methämoglobin gemessen. Sie liegt höher als die Hämoglobinoxidationsgeschwindigkeit durch Sulfanilamid (vergl. Thauer, 64) und

durch andere therapeutisch verwendete aromatische Amine, z.B. Sulfapyridin, Sulfamethoxypyridazin und Sulfamethoxydiazin. Bei Inkubation von Dapson im gleichen System mit Mikrosomen von Kaninchen, die mit Phenobarbital vorbehandelt waren, zeigte sich eine noch größere Geschwindigkeit der Methämoglobinbildung.

Daraufhin wurden die synthetischen N-Hydroxy-Derivate von Dapson nur mit Erythrozyten inkubiert. Die verschiedenen Oxidationsgeschwindigkeiten von Hämoglobin durch kleine Konzentrationen von DDS-NOH und DDS-di-NOH (10 nMol/ml) zeigen, daß die Hydroxylamine die eigentlich oxidierenden Moleküle sind.

In vitro katalysiert DDS-di-NOH (10 µM) die Methämoglobinbildung in Rindererythrozyten unter gleichen Versuchsbedingungen ähnlich schnell wie Phenylhydroxylamin (10 µM). Durch den in Abb. 18 abgebildeten Kreisprozess sind nur katalytische Mengen von DDS-NOH nötig um eine Methämoglobinämie hervorzurufen. Unter den erwähnten Versuchsbedingungen oxidierte ein Mol DDS-NOH in diesem Kreisprozess 190 Mole Hämoglobin in einer Stunde.

Es ist bekannt, daß auch Orthoaminophenole in geringerem Ausmaße die Oxidation von Hämoglobin bewirken (98). Ähnlich wie bei Sulfanilamid (99), könnten aus Dapson auch o-Hydroxy-Metabolite gebildet werden. Diese o-Aminophenole von Dapson wurden bisher nicht nachgewiesen. Außerdem ist bekannt, daß z.B. 3-Hydroxysulfanilamid ein sehr schwacher Methämoglobinbildner ist (45). Falls ein solcher

Metabolit von DDS existiert, würde er nach den obigen Befunden über die Geschwindigkeit der Methämoglobinbildung durch DDS-NOH nicht signifikant zur Hämoglobinoxidation beitragen.

Eine kürzlich erschienene Arbeit über die Methämoglobinbildung durch eine Reihe von DDS-Derivaten (100) zeigte ebenfalls, daß nur DDS-NOH Hämoglobin oxidierte.

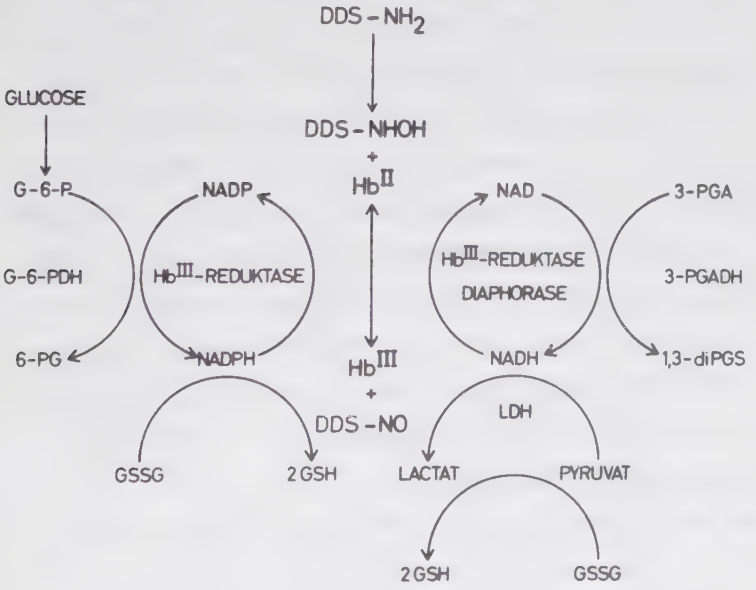


Abb. 18: Schema des Kreisprozesses der Methämoglobinbildung durch DDS-NOH bzw. DDS-di-NOH in Erythrozyten (nach Wagner und Burger, 101).

4.2. Quantitative Bestimmung von DDS-NOH

Primäre aromatische Hydroxylamine sind sehr instabil und reaktiv, deshalb wurden diese Metabolite bisher überwiegend in die Nitrosoform überführt und in dieser Form gemessen (82). Da bei der Bestimmung von N-Hydroxy-Dapson wegen der zwei Aminogruppen im Molekül dieser Weg nicht beschritten werden konnte, wurde DDS-NOH direkt als Hydroxylamin bestimmt.

DDS-NOH ist in Lösungen über pH 7,6 - 7,8 instabil. Aus Puffer mit pH 7 kann DDS-NOH mit Äther quantitativ (ca. 98%) extrahiert werden. In organischen Lösungsmitteln z.B. alkalischer Alkohollösung wird DDS-NOH in Gegenwart von Sauerstoff zu DDS-Azoxy oxidiert. Eine Lösung von DDS-NOH färbt sich in vielen organischen Lösungsmitteln bei Zimmertemperatur sofort oder nach wenigen Minuten gelb. In peroxidfreiem Äther erwies sich DDS-NOH als relativ stabil. Daher wurde Äther trotz seiner hohen Flüchtigkeit (zur quantitativen Bestimmung deshalb unbeliebt) als Extraktionsmittel verwendet.

Löst man reines DDS-NOH in Äther und entfernt diesen Äther mittels Durchströmen von Stickstoff (wie zur Dünnschichtchromatographie erforderlich), so wird DDS-NOH z.T. zu DDS-NO_2 oxidiert. Es wurden also zwei sekundäre Oxidationsprodukte von N-Hydroxydapson nämlich DDS-NO_2 und DDS-Azoxy gefunden. Um eine Oxidation von DDS-NOH zu DDS-Azoxy bei zu hohem pH oder in Äther zu DDS-NO_2 durch längeres Stehen zu vermeiden, wurden alle Proben zur DDS-

NOH-Bestimmung nach der Hydrolyse auf ca. pH 5 abgepuffert, sofort mit Äther ausgeschüttelt und mit der Fe^{2+}-Bathophenanthrolin-Methode bestimmt.
Durch andere bei pH 5 in Äther extrahierbare reduzierende oder oxidierende Stoffe in Mikrosomen oder im Urin kann die DDS-NOH Bestimmung beeinflußt werden. Zur Überprüfung dieser Bestimmungsmethode wurde p-Chloranilin mit Mikrosomen inkubiert und das entstandene p-Chlorphenylhydroxylamin sowohl mit der Bathophenanthrolin-Methode bestimmt, als auch nach Oxidation mit Fe^{3+} als p-Chlornitrosobenzol nach Diazotieren und Kuppeln gemessen. Die Methämoglobinbildung in Erythrozyten durch normalen Urin mit zugesetztem DDS-NOH wurde mit der Methämoglobinbildung durch biologisch entstandenes DDS-NOH im Urin behandelter Menschen verglichen (Siehe p-Chlorphenylhydroxylamin- und Methämoglobinbildung in Abhängigkeit von der Zeit, Abb. 7 und 17).
In beiden Versuchen (Vergleich der Bestimmungsmethoden und Vergleich der Geschwindigkeiten der Methämoglobinbildung) verlaufen die entsprechenden Kurven parallel und sind nahezu identisch. Dies bedeutet eine gute Sicherung der Bestimmungsmethode für DDS-NOH unter den in 2.2.2.2. aufgeführten Versuchsbedingungen.

4.3. Mikrosomale N-Hydroxylierung von Dapson

Die biologische N-Hydroxylierung von Dapson verhält sich

wie andere mikrosomale mischfunktionelle Oxidationen. Die Reaktion zeigt typische Abhängigkeiten von der Konzentration des mikrosomalen Proteins (Emzymsystem), der Dapsonkonzentration, der NADPH Konzentration und dem pH.

Allerdings kann die Abnahme der DDS-NOH Bildung (s.Abb. 11) bei höherem pH als pH 7,6 auch z.T. durch die Instabilität des DDS-NOH in alkalischem Medium vorgetäuscht werden.

Phenobarbitalvorbehandlung von Versuchstieren vermehrt die Ausscheidung von N-Hydroxyprodukten von Arylaminen, wie 2-Naphtylamin (91,102), 4-Aminobiphenyl (90) und p-Phenetidin (103) und steigert ebenfalls in vitro die Geschwindigkeit der mikrosomalen N-Hydroxylierung von Anilin und ringsubstituierten Anilinen (82,90,92,103). Dementsprechend läßt sich auch die mikrosomale N-Hydroxylierungsgeschwindigkeit von Dapson, einem primären aromatischen Amin, durch Phenobarbitalvorbehandlung der Versuchstiere erhöhen. Die Steigerung der DDS-NOH Bildung durch Mikrosomen von Phenobarbital vorbehandelten Tieren entspricht etwa der erhöhten Konzentration von Cytochrom P-450 in der mikrosomalen Fraktion.

Metyrapon ist ein Inhibitor der Cytochrom P-450 Funktion in Mikrosomen (96). Uehleke (67,68,104) stellte fest, daß Metyrapon die N-Hydroxylierung von primären aromatischen Aminen wie p-Chloranilin und Naphtylamin hemmt, aber keine Hemmung bei der N-Oxidation von N-Methylanilin und

N,N-Dimethylanilin bewirkt. Metyrapon hemmt die N-Hydroxylierung von Dapson in einer für diese Reaktion typischen Weise. Bei gleicher Konzentration von Hemmstoff (1 mM) und Dapson (1 mM) wird die Bildung des DDS-NOH um 70% herabgesetzt. Unter gleichen Versuchsbedingungen (Metyrapon 1 mM, Substrat 1 mM, Inkubationszeit 10 min) fand Uehleke (70) eine 60% Hemmung der Hydroxylaminbildung aus p-Chloranilin.
Über die Hemmung der mikrosomalen N-Oxidation von aromatischen Aminen durch CO herrschte lange Zeit Unklarheit.
Im Gegensatz zu dem Hemmeffekt von CO auf die Anilin-C-Hydroxylierung und die Desalkylierung von N-Äthylanilin fanden Kampffmeyer und Kiese (94) durch CO keine Hemmung der N-Oxidation von N-Äthylanilin oder Anilin. Die Versuche wurden mit Suspensionen von Kaninchenlebermikrosomen unter verschiedenen Partialdrucken von O_2 und CO durchgeführt. In einer späteren Arbeit stellten die Autoren fest (105), daß die N-Oxidation von Anilin bei niedrigen Mikrosomen-Konzentrationen in den Inkubationsansätzen durch CO gehemmt wird. Bei höherem Proteingehalt (10 mg/ml und höher) verminderte CO die N-Hydroxylierung von Anilin nicht mehr. Bei noch höherem Proteingehalt (20 mg/ml) nahm die N-Hydroxylierung von Anilin unter CO sogar zu.
Außer dem sehr hohen Proteingehalt in den Inkubaten mit CO dürften die Experimente von Hildebrandt et al. (106) noch eine weitere Erklärung dafür sein, daß z.T. keine Hemmung der N-Hydroxylierung von aromatischen Aminen durch CO gefunden wird. Sie zeigten, daß CO und Metyrapon nicht mehr hemmen, wenn die Konzentration von NADPH erheblich unter der

Sättigungskonzentration für die mikrosomalen Oxidationen liegt. Das war in den ersten Versuchen von Kampffmeyer und Kiese der (94) Fall.

Man nahm bisher überwiegend an, daß die Affinität von CO zu mikrosomalem P-450 kleiner als die Affinität von O_2 sei. Neue Messungen durch Gleichgewichtsverschiebung mittels "Blitzlicht-Photolyse" der O_2 und CO Komplexe (Rösen und Stier, 107) ergaben aber fast gleiche Affinitäten von CO und O_2 ($K_{O_2} = 1.46 \times 10^{-6}$M, $K_{CO} = 1{,}3 \times 10^{-6}$M). Allerdings ist die Geschwindigkeit der Bildung von oxigeniertem Cytochrom P-450 in Gegenwart von Substraten größer als die Kombination mit CO (107). Verschiedene Versuche in mehreren Laboratorien mit Inkubationen von Arylaminen in einer Atmosphäre von 50% O_2 und 50% CO zeigten keine klare Hemmungen der N-Oxidationen, wahrscheinlich weil durch überströmen der Inkubate mit den Gasmischungen kein Gleichgewichtszustand erreicht wurde. Außerdem besitzen die Arylhydroxylamine selbst eine gewisse Affinität zu oxidiertem Cytochrom P-450. In Inkubaten mit Mikrosomen und Arylamien werden durch CO-Sättigung der Ansätze vor der Extraktion mit CCl_4 in Gegenwart von Fe^{3+} deutlich mehr N-Oxidationsprodukte extrahiert als ohne CO-Sättigung (70).

In einem Gasgemisch von 2% O_2 in CO (Kontrolle 2% O_2 in N_2) wurde die N-Hydroxylierung von Dapson etwa um 50% gehemmt. Dieser Wert stimmt gut mit den von Heinze et al. (108) mit Anilin gemessenen Ergebnissen überein. Sie erhielten eine fast 50% CO-Hemmung der Anilin N-Hydroxylie-

rung unter gleichem Sauerstoffpartialdruck in einem Inkubat mit 1 mg Mikrosomenprotein.

4.4. Identifizierung der Metabolite durch Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographische Trennungen von Urinextrakten vor und nach Säurehydrolyse und von Mikrosomenextrakten zeigen außer der Ausgangssubstanz DDS noch zwei zusätzliche Flecken, von denen einer DDS-NOH und der andere DDS-NO_2 entspricht. Obwohl DDS-NOH in großer Menge im Urin ausgeschieden wird, konnte auf den Dünnschichtchromatogrammen kein DDS-di-NOH im Urin gefunden werden. Falls die Ausscheidung von DDS-di-NOH weniger als 0,5% der gegebenen Dosis beträgt, kann mit dieser Methode DDS-di-NOH nicht mehr nachgewiesen werden.

Das durch Dünnschichtchromatographie nachgewiesene DDS-NO_2 ist ein bei der Aufarbeitung nichtenzymatisch entstandenes Oxidationsprodukt von DDS-NOH. Tyler et al. (109) fanden nach Inkubation von DDS mit Rattenlebermikrosomen ein Produkt, das sie als DDS-NO_2 identifizierten. Dieses Produkt wurde in ähnlicher Größenordnung gebildet wie bei unseren Untersuchungen DDS-NOH durch Kaninchenlebermikrosomen. Auch bei Tyler dürfte DDS-NO_2 durch Aufarbeiten aus Mikrosomenansätzen und besonders durch das Einengen des Äthylacetatextraktes am Rotationsverdampfer unter Luft nichtenzymatisch aus DDS-NOH entstanden sein. Die Autoren selbst ziehen diese Möglichkeit in Betracht. Bisher wurde die biologische Oxidation von Arylaminen zu Nitroverbin-

dungen bei Säugern nicht beobachtet.

4.5. Dapson-Stoffwechsel im Hund

Beagle Hunde scheiden innerhalb von 48 Stunden nach oraler Gabe von 50 mg Dapson pro kg 7 - 9% der Dosis als N-Hydroxy-Dapson im Urin aus. Die Gesamtausscheidung von Dapson und seiner Metabolite beträgt in 48 Stunden 52 - 62%. 13 - 15% der ausgeschiedenen Dosis sind also N-Hydroxymetabolite von Dapson.
Freies (= unkonjugiertes) DDS-NOH konnte nicht in allen Urinproben gefunden werden. Bei zwei Hunden ("B_{15}" und "B_{14}") wurde kein freies DDS-NOH im Urin nachgewiesen. Das gesamte in 48 Stunden ausgeschiedene freie DDS-NOH liegt tiefer als 1% der Dosis. Die DDS-NOH Konjugate im Urin beginnen bereits unter pH 6 aufzuspalten. Daher könnte die tatsächliche Ausscheidung von freiem DDS-NOH noch geringer oder überhaupt fraglich sein.
Während der ersten 12 Stunden nach oraler Verabreichung zeigen die Ausscheidung der DDS-Metabolite im Urin, die DDS Plasmaspiegel und entsprechend die Methämoglobinspiegel bei den verschiedenen Hunden größere Unterschiede. Sie sind zumindest teilweise durch die individuell verschiedene Resorption von Dapson erklärbar.

4.6. Dapson-Stoffwechsel im Menschen

Nach oralen Gaben von 200 mg Dapson beträgt die Summe aller

Ausscheidungsprodukte im menschlichen Urin 72 - 78% der Dosis in 72 Stunden. In bisherigen Untersuchungen über den Stoffwechsel des Dapsons im Menschen wurden diese Werte etwas niedriger angegeben (38,51,54). Diese Bearbeiter bestimmten nur freies und konjugiertes Dapson entweder durch Diazotierung und Kuppeln oder fluorometrisch. Bei diesen chemischen Methoden wird DDS-NOH, soweit es nicht zu DDS-Azoxy oxidiert wurde, mitgemessen, aber es wird nicht voll erfaßt.

5 - 10% der ausgeschiedenen Dosis liegt als freies DDS im Urin vor. Hier weichen die Angaben in der Literatur sehr voneinander ab. Sie reichen von 0 - 20% freies DDS im Urin (36,51,55,110,111). Bei den einzelnen Versuchspersonen bestehen offensichtlich beträchtliche Schwankungen.

Beim Menschen wird ein erstaunlich hoher Prozentsatz (30 - 40%)als freies und konjugiertes Mono-N-Hydroxy-Dapson im Urin ausgeschieden. Die Ausscheidung ist selbst nach 72 Stunden noch nicht beendet. 4 - 7% der Gesamtdosis werden als freies DDS-NOH ausgeschieden. Da die DDS-NOH Konjugate ab pH 6 nicht mehr stabil sind, kann je nach pH des Urins die tatsächliche Ausscheidung von freiem DDS-NOH geringer sein.

Durch Säurehydrolyse mit 1 N HCl bei Zimmertemperatur werden nicht alle DDS-NOH Konjugate aufgespalten. Nach Inkubation des Urins mit β-Glucuronidase unter Stickstoff konnten noch weiter 3 - 8% (bezogen auf die DDS-

NOH Ausscheidung) N-Hydroxy-Dapson gefunden werden. Die Behandlung des Urins mit Glusulase (Glucuronidase und Sulfatase) ergab einen weiteren Anstieg von DDS-NOH im Urin. Bei 3 Versuchspersonen wurden mehr als die Hälfte einer einzelnen Dapsondosis als N-Hydroxy-Dapson ausgeschieden.

Nach einer Mitteilung dieser Befunde (112,113) erschien mittlerweile eine Arbeit von Israili et al. (114) über den Stoffwechsel von Dapson beim Menschen. Die Autoren verabreichten ^{14}C-markiertes DDS (20 mg) an Patienten und maßen die Ausscheidung von N-Oxidationsprodukten nach Zusatz von NaOH und Pyridin als DDS-Azoxy im Urin. Mit dieser Methode wurden fast die gleichen Ergebnisse wie bei unseren Versuchspersonen gefunden. Bei 4 verschiedenen Patienten waren 30 - 50% der im Urin vorhandenen Aktität (^{14}C) in das Azoxyderivat überführbar.

Abb. 19 zeigt eine Übersicht der Stoffwechselwege von Dapson.

Trotz der wahrscheinlich hohen Plasmawerte der N-Hydroxy-Metabolite des DDS wurden hier und von anderen Untersuchern (65) nur niedrige Methämoglobinwerte im Blut der Versuchspersonen gefunden. Das deutet darauf hin, daß das im Blut zirkulierende DDS-NOH wahrscheinlich recht vollständig konjugiert ist.

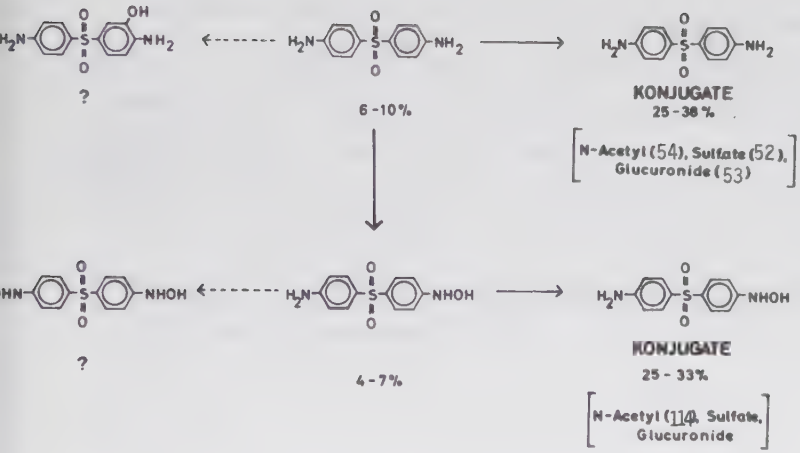


Abb. 19: Stoffwechsel von Dapson. Ausscheidung im Urin als Prozent der Dosis innerhalb von 72 Stunden. Die Gesamtausscheidung in der selben Zeit beträgt 70 - 80%.

Die Frage, ob die N-Hydroxylierungsprodukte des Dapson zur chemotherapeutischen Wirksamkeit des Dapsons beitragen, wurde von Popoff et al. (115) untersucht. DDS-NOH soll bei Mäusen die gleiche Antimalariaaktivität wie Dapson besitzen. Das bis-N,O-Diacetylhydroxylamin von DDS scheint noch größere Aktivität als DDS aufzuweisen, während das freie Dihydroxylamin von DDS unwirksam war (116). Da jedoch die Konzentrationen von freiem DDS-NOH im Blut sehr gering sind, kann man daraus wenig Schlüsse ziehen. Die mögliche Bildung von reaktiven N-Hydroxymetaboliten auch in extrahepatischen Geweben (vgl. Uehleke, 68) könnte manche toxischen Symptome erklären.

Bisher war man allgemein der Ansicht, daß die N-Hydroxylierung von Arylaminen nur ein prozentual geringer Stoffwechselweg im Vergleich zur Acetylierung, Ringhydroxylierung und Glucuronidierung darstellt. Die Biotransformation von Dapson beim Menschen ist das erste Beispiel, bei dem die N-Hydroxylierung eines Fremdstoffes den hauptsächlichen Stoffwechselweg darstellt.
Kürzlich berichteten Mather und Thomas (117), daß Xylocain zu etwa 25% als N-Oxidationsprodukt ausgeschieden wird.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Toxische Nebenwirkungen bei der Therapie mit 4,4'-Diaminodiphenylsulfon sind besonders Methämoglobinbildung und Cyanosen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit nach den möglichen und vermuteten N-Hydroxymetaboliten von Dapson in vitro und in vivo gesucht.

1. Während der Inkubation von Dapson mit Kaninchenlebermikrosomen, NADPH und Rindererythrozyten wird schnell Hämoglobin zu Methämoglobin oxidiert. Die Oxidationsgeschwindigkeit steigt mit Lebermikrosomen von Phenobarbital vorbehandelten Kaninchen um das 2 - 3 fache an.
2. Daraufhin wurden die möglichen N-Oxidationsmetabolite von Dapson, nämlich DDS-NOH und DDS-di-NOH und deren weitere Oxidationsprodukte, synthetisiert und die Struktur durch NMR, Massenspektrum und Elementaranalyse gesichert.
3. Diese N-Oxidationsprodukte oxidieren in Erythrozyten (ohne Mikrosomen) Hämoglobin; DDS-NOH (10 µM) bildet in 60 min 25% und DDS-di-NOH (10 µM) 40% Methämoglobin. Dapson selber ist unter diesen Bedingungen unwirksam.
4. Die Metabolite des Dapson wurden aus Inkubaten mit Mikrosomen und aus Urin extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie identifiziert. Es wurde nur DDS-NOH und kein DDS-di-NOH gefunden.

5. Lebermikrosomen von Kaninchen katalysieren die N-Hydroxylierung von Dapson in Gegenwart von Sauerstoff und NADPH. Die Oxidation ist abhängig von der Proteinkonzentration, der Dapsonkonzentration, dem NADPH-Gehalt und vom pH Wert. Die Geschwindigkeit der Bildung von DDS-NOH mit Mikrosomen von Phenobarbital vorbehandelten Kaninchen ist 2 - 3 mal größer als mit Mikrosomen von normalen Tieren. CO und Metyrapon hemmen die mikrosomale N-Hydroxylierung von DDS. Diese von Cytochrom P-450 abhängige N-Hydroxylierung gehört zu den mischfunktionellen Oxidationen.
6. Nach Verabreichung von 50 mg DDS pro kg bilden Hunde maximale Methämoglobinkonzentrationen von 8 - 13%. Es werden kein oder nur sehr kleine Mengen von freiem DDS-NOH im Urin ausgeschieden. 7 - 10% der oralen Dosis werden in Form von konjugiertem DDS-NOH (Säurehydrolyse von 1 N HCl bei Zimmertemperatur) in 48 Stunden ausgeschieden.
7. Die Gesamtausscheidung von Dapson und seinen Metaboliten nach oraler Gabe von 200 mg Dapson an freiwillige Versuchspersonen beträgt in 72 Stunden 72 - 78% der Dosis. 0,9 - 3,4% der Dosis werden in 24 Stunden als freies DDS-NOH und 6 - 20% als konjugiertes säurelabiles DDS-NOH ausgeschieden. Nach 72 Stunden findet man 5 - 7,5% dieser Dosis als freies DDS-NOH und 25--33% als konjugiertes säurelabiles DDS-NOH im Urin. Die Dapson N-Hydroxymetabolite erreichen bei einigen Versuchspersonen mehr als 50% der insgesamt im Urin aus-

geschiedenen Produkte. Der Stoffwechsel von Dapson im Menschen ist das erste Beispiel, bei dem die N-Hydroxylierung der überwiegende Metabolisierungsweg ist.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Fromm,E., Wittmann,J.: Ber.Deutsch. Chem. Ges. 41, 2264-2273 (1908).

2. Buttle,G.A.H., Stephenson,D., Smith,S., Dewing, T., Foster,G.E.: Lancet 232, 1331-1334 (1937).

3. Fourneau,E., Tréfouel,J., Nitti.F., Bovet,D., Tréfouel,J.: C. R. Acad. Sci. 204, 1763-1766 (1937).

4. Bushby,S.R.M.: "Chemotherapy," in Cochrane,R.G., Davy,T. (Herausgeber): Leprosy in Theory and Practice, ed 2, Baltimore: Williams and Wilkins Co, 1964.

5. Lowe,J.:
Lancet 1, 145-150 (1950).

6. Cilag, Felder,E:FP. 955 144, 1947/50.

7. Bauer,H.: J. Amer. chem. Soc. 61, 617-618 (1939).

8. Farbenfabriken Bayer, Behnisch,R., Pöhls,P.: DBP. 870 266, 1941/53, Chem. Zbl. (1953), 6096.

9. Parke Davis, E.P. 532 893, Chem. Abstr. 36, 1044 (1942).

10. Siegfried, Schwz. P. 234 108, 1944; Chem. Abstr. 43, 4297 (1949).

11. Cowdry, E.V., Ruangsiri,C.: Arch. Path. 32, 632-640 (1941).

12. Faget,G.H., Pogge,R.C., Johansen,F.A., Dinan,J.F., Prejean,B.M., Eccles,C.G.: Public Health Rept. (U.S.) 58, 1729-1741 (1943).

13. Guinto,R.S., Binford,C.H.: Medical Bull., MG-10, Dept. Med. Surgery, Vet. Adm., Wash., D.C. May 25 1965.

14. Lowe,J., Smith,M.: Int. J. Leprosy 17, 181-195 (1949).

15. Titus,E., Bernstein,J.: Ann. NY Acad. Sci. 52, 719-728 (1949).

16. Francis, J., Spinks,A.: Brit. J. Pharmacol. 5, 565-583 (1950).

17. Cochrane,R.G., Ramanujan,K., Paul,H., Russel,D.: Leprosy Rev. 20, 4-64 (1949).

18. Shepard, C.C., McRae,D.H., Habas,J.A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122, 893-896 (1966).

19. Petit,J.H.S., Rees,R.J.W.: Int. J. Leprosy, 35, 140-148 (1967).

20. Browne,S.G.: Leprosy in India 37, 180-183 (1965).

21. Shepard,C.C.: Ann. Rev. Pharmacol. 9, 37-50 (1969).

22. DeGowin, R.L.: Arch. Intern Med. 120, 242-248 (1967).

23. Boughton,C.R., Scott,G.C., Russel,D.A., Vincin, D.R.: Med. J. Austr. 1, 1258-1263 (1971).

24. Coggeshall,L.T., Maier,J. Best,C.A.: JAMA 117, 1077-1081 (1941).

25. Bruce-Chwatt,L.J.: WHO Chron. 15, 128-133 (1961).

26. WHO Scientific Group on Resistance of Malaria Parasites to Drugs.
WHO Techn. Rep. Ser. 296, (1965).

27. Powell,R.D., DeGowin,R.L., Eppes,R.B.: Amer. J. Trop. Med. Hyg. 14, 913-921 (1965).

28. DeGowin,R.L., Eppes,R.B., Carson,P.E., Powell,R. D.: Bull. World. Health Organ. 34, 671-681 (1966).

29. Joy,R.J., Gardened,W.R., Tigerit,W.D.: Mil. Med. 134, 497-501 (1969).

30. Eppes,R.B., McNamara,J.V., DeGowin,R.L., Carson, P.E., Powell,R.D.: Military Med. 132, 163-175 (1967).

31. Clyde,D.F., Rebert,C.C., McCarthy,V.C., Miller, R.M.: Military Med. 136, 836-841 (1971).

32. Esteves,J., Brandao,F.N.: Tab. Soc. portug. Derm. Vener. 8, 209-213 (1950).

33. Morgan,J.K., Marsden,C.W., Coburn,J.G., Murgavin, J.M.: Lancet, 268, 1197-1200 (1955).

34. Alexander,J.O.D.: Lancet 268, 1201-1202 (1955).

35. March,C., Sawichy,H.H.: Arch. Derm. 85, 751-752 (1962).

36. Alexander,J.O.D., Young,E., McFadyen,T., Fraser, N.G., Duguid,W.P., Meredith,E.M.: Brit.J. Derm. 83, 620-631 (1970).

37. Lowe,J.: Leprosy Rev. 23, 4-29 (1952).

38. Glazko,A.J., Dill,W.A., Montalbo,R.G., Holmes,E.L.: Am. J. Trop. Med. Hyg. 17, 465-473 (1968).

39. Bushby,S.R.M.: Int. J. Lep. 35, 572-579 (1967).

40. Gisslen,H., Hersle,K.: Brit. J. Derm. 76, 315-317 (1964).

41. Pengelly,C.D.R.: Brit.Med. 2, 662-664 (1963).

42. Desforges,J.F., Thayer,W.W., Dawson,J.P.: Am.J.Med. 27, 132-136 (1959).

43. DeGowin, R.L., Bull. WHO 35, 165-179 (1966).

44. Ognibene,A.J.: Annals Intern. Med. 72, 521-524 (1970).

45. Cohen,R.J., Sachs,J.R., Wicker,D.J., Conrad,M.E.: New Engl. J. Med. 279, 1127-1131 (1968).

46. Wyatt,E.H., Stevens,J.C.: Brit.J. Derm. 86, 521-523 (1972).

47. Leiker,D.L.: Int. J. Lep. 24, 402-405 (1956).

48. Smith,M.: Leprosy Rev. 20, 78-88 (1949).

49. Chatterjee,K.R., Poddar,R.K.: Proc. Soc. exp. Biol. 94, 122-124 (1957).

50. Peters,J.H., Gordon,G.R., Gelber,R., Levy,L.: Int. J. Lerosy 37, 463 (1969).

51. Ellard,G.A.: Brit. J. Pharmacol. 26, 212-217 (1966).

52. Bushby,S.R.M., Woidwood,A.J.: Biochem. J. 63, 406-408 (1956).

53. Tsutsumi,S.: Chem. Pharm. Bull. 9, 432-436 (1961).

54. Gelber,R., Peters,J.H., Gordon,G.R., Glazko,A. J., Levy, L.: Clin. Pharmacol. Ther. 12, 225-238 (1971).

55. Gordon,G.R. Peters,J.H.,Gelber,R., Levy,L.: Proc. Western Pharm. Soc. 13, 17-24 (1970).

56. Levy,L., Biggs,J.T., Gordon,G.R., Peters,J.H.: Proc. Soc. Exptl. Biology and Medicine 140, 937-943 (1972).

57. Uehleke,H.: Fortschr. Arzneimittel-Forsch. 8, 195-260 (1964).

58. Kiese,M., Uehleke,H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 242, 117-129 (1961).

59. Uehleke,H.: V. Internat. Kongr. Biochem., Moskau, August 1961. Abstr. S. 399. London: Pergamon Press 1962.

60. Uehleke,H.: First Intern. Pharmacol. Meeting, Stockholm 1961, Vol.6 p.31. London: Pergamon Press 1962.

61. Friederiszick,K.F., Toussaint,W.: Med. Klin. 55, 459-461 (1960).

62. Sandner, U.: Kinderärztl. Prax. 30, 199-204 (1962).

63. Thauer,R.K., Stöffler,G., Uehleke,H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 252, 32-42 (1965).

64. Thauer,R.K., Meiforth,A., Uehleke,H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 252, 291-296 (1965).

65. Hjelm, M., deVerdier,C.H.: Biochem.Pharmacol. 14, 1119-1128 (1965).

66. Uehleke,H., Schnitger,F., Hellmer,K.H.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 351, 1475-1484 (1970).

67. Uehleke,H., Breyer,U., Budczies,B., Tabarelli, S., Hellmer,K.H.: Hoppe-Seylers Z. ph-ysiol. Chem. 352, 403-411 (1971).

68. Uehleke,H.: Xenobiotica 1, 327-338 (1971).

69. Uehleke,H.: Proc. 5th Int. Congr. Pharmacology, vol.2. pp.124-136 (Karger, Basel 1973).

70. Uehleke,H.: Drug. Metab. Dispos. 1, 299-313 (1973).

71. Lantz: French Patent 715,859; English Patent 376, 961; U.S. Patent 1, 965,770.

72. Sassosow,W.A., Galtschenko, M.J.: Chem. Zbl. (1947), 454-455.

73. Raiziss,G.W., Clemence,L.W., Severac,M., Moetsch, J.C. : J. Amer. chem. Soc. 61, 2763-2765 (1939).

74. Gabel,Yu.O., Grinberg,F.L.: Chem. Abstr. 34, 6244 (1940)

75. Jackson,E.L.: J. Amer. chem. Soc. 68, 1438-1442 (1946).

76. Bamberger,E., Baudisch,O.: Ber. dtsch. chem. Ges. 42 III, 3568-3582 (1909).

77. Ingold,K.C.: J. chem. Soc. 125, 87-102 (1924).

78. Levi,A.A., Snow,G.A.: Brit. J. Pharmacol. 15, 160-164 (1960).

79. Bratton,A.C., Marshall,E.K.: J. Biol. Chem. 128, 537-550 (1939).

80. Peterson,R.E.: Analyt. Chem. 25, 1337-1339 (1953).

81. Das,M.L., Ziegler,D.M.: Arch. Biochem. Biophys. 140, 300-306 (1970).

82. Uehleke,H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 259, 66-90 (1967).

83. Omura,T., Sato,R.: J. Biol. Chem. 239, 2370-2378 (1964).

84. Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L., Randall, R.J.: J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951).

85. Kiese,M.: Pharmacol. Rev. 18, 1091-1161 (1966).

86. Kiese,M., Reinwein,D., Waller,H.D.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 210, 393-398 (1950).

87. Linderstrøm-Lang,C.U., Naylor,R.F.: Biochem. J. 83, 417-420 (1962).

88. Remmer,H.: Proc. Europ. Soc. Study Drug Toxicity Vol. IV, 57-75 (1964).

89. Conney,A.H.: Pharmacol Rev. 19, 317-366 (1967).

90. Uehleke,H., Nestel,K.: Arch. Pharmakol. Exp. Pathol. 257, 151-171 (1967).

91. Uehleke,H.: Arzneimittelforschung 19, 1033-1039 (1969).

92. Lange,G.: Arch. Pharmakol. Exp. Pathol. 257, 230-256 (1967).

93. Ryan,K.J., Engel,L.L.: J. Biol. Chem. 225, 103-114 (1957).

94. Kampffmeyer,H., Kiese,M.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 250, 1-8 (1965).

95. Kampffmeyer,H., Kiese,M.: Biochem.Z. 339, 454-459 (1964).

96. Netter,K.J., Jenner,S., Kajuschke,K.: Arch. Pharmakol. Exp. Pathol. 259, 1-16 (1967).

97. Weisburger,J.H., Weisburger,E.K.: Handbook of Exp. Pharmacol., Vol. XXVIII/2, pp. 312-333. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1971.

98. Kiese,M., Renner,G.: Arch. Pharmacol. 270, R72 (1971).

99. Williams, R.T.: Biochem.J.41, 1-8 (1947).

100. Kramer,P.A., Glader,B.E., Li,T.K.: Biochem. Pharmacol. 21, 1265-1274 (1972).

101. Wagner,J., Burger,A.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 254, 138-151 (1966).

102. Uehleke, H.,Brill,E.: Biochem. Pharmacol. 17, 1459-1461 (1968).

103. Uehleke,H.: Arch. Pharmak. 264, 434-461 (1969).

104. Uehleke,H., Hellmer,K.H.: Arch. Pharmak. 268, 242-246 (1971).

105. Hlavica,P., Kiese,M., Lange,G., Mor,G.: Arch. Pharmakol. exp. Pathol. 263, 269-270 (1969).

106. Hildebrandt,A.G., Franklin,M.R., Roots,J., Estabrook,R.W.: Chem.-Biol. Interactions 3, 276-278 (1971).

107. Rösen,P., Stier,A.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 603-611 (1973).

108. Heinze,E., Hlavica,P., Kiese,M., Lipowsky,G.: Biochem. Pharmacol. 19, 641-649 (1970).

109. Tyler,T.R., Buhs,R.P., vandenHeuvel,W.J.A.: Biochem. Pharmacol. 22, 1383-1385 (1973).

110. Bushby,S.R.M., Woiwod,A.J.: Ann. Rev. Resperatory Diseases 72, 123-125 (1955).

111. Ellard,G.A., Gammon,P.T.: Int.J. Leprosy 36, 651-652 (1968).

112. Tabarelli,S. Uehleke,H.: Xenobiotica 1, 501-502 (1971).

113. Uehleke,H.,Tabarelli,S.: Arch.Pharmacol. 278, 55-68 (1973)

114. Israili,Z.H., Cucinell,S.A., Vaught,J., Davis, E., Lesser,J.M., Dayton,P.G.: J. Pharmacol. Exp. Therap. 187, 138-151 (1973).

115. Popoff,I.C., Singhal,G.H., Engle,A.R.: J. med. Chem. 14, 550-551 (1971).

116. Loev,B., Dowalo,F., Theodorides,V.J., Vogh, B.P.: J. med. Chem. 16, 161-163, (1973).

117. Mather,L.E., Thomas,J.: Li. Sci. 11, 915-919 (1972).

Lebenslauf

Am 13.3.1944 wurde ich als Tochter des Ingenieurs Heinrich Tabarelli und seiner Ehefrau Anneliese geb. Platz in Trechtingshausen (Krs. Bingen) geboren.
Dort wurde ich Ostern 1950 eingeschult. Da wir 1952 nach Lengerich (Westfalen) zogen, besuchte ich dort die Volksschule weiter. Ostern 1954 wechselte ich zur Realschule in Lengerich über. Von Oktober 1956 bis zum Abitur am 1.3.1963 besuchte ich das neusprachliche Gymnasium in Rheinhausen (Niederrhein).
Im Sommersemester 1963 immatrikulierte ich mich an der Universität Tübingen für das Fach Biochemie.
Im Frühjahr 1964 legte ich den ersten Teil des Vordiploms und im Herbst 1966 den zweiten Teil des Vordiploms ab.
Die Hauptdiplomprüfung in Physiologischer Chemie und Biochemie bestand ich in den Fächern Biochemie, Organische Chemie und Pharmakologie im Januar 1969. Anschließend arbeitete ich an meiner Diplomarbeit über das Thema: "Untersuchungen über die Aktivität und Anreicherung von Glycyl-Glycin-Dipeptidase aus verschiedenen Heferassen."

Seit 1.1.1970 bin ich im Institut für Pharmakologie tätig. Die vorliegende Dissertation wurde von November 1970 bis Dezember 1973 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr.med. Dipl. Chem. H. Uehleke im Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen angefertigt.
Im Dezember 1972 heiratete ich den Gerichtsreferendar Joachim Poplawski.

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie:	G.Weitzel, F.Schneider, L.Flohé
Organische Chemie:	E.Müller, E.Bayer, M. Hanack
Anorganische Chemie:	W.Rüdorff, E.Stumpp, W.Bues
Physikalische Chemie:	G.Kortüm, H. Mauser
Physik:	H.Krüger
Mathematik:	W.Schweizer
Anatomie:	K.Mörike, W.Graumann
Botanik:	E.Bünning, H.Metzner
Zoologie:	K.G.Grell
Mikrobiologie:	H.Zähner, F.Lingens
Physiologie:	K.Brecht
Pharmakologie:	H.Uehleke, H.Remmer

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
7000 Stuttgart 1, Forststr. 58
Telefon (0711) 61 06 41 / 42

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
7000 Stuttgart 1, Forststr. 58
Telefon (0711) 61 06 41 / 42